



HAL
open science

Etude de la biodiversite de la flore levurienne d'interêt technologique isolee du lait cru de chamelle

Soufian Ider

► **To cite this version:**

Soufian Ider. Etude de la biodiversite de la flore levurienne d'interêt technologique isolee du lait cru de chamelle. Sciences du Vivant [q-bio]. Universite d'Oran 1, 2020. Français. NNT: . tel-04549476

HAL Id: tel-04549476

<https://theses.hal.science/tel-04549476>

Submitted on 17 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°/...../2020



Thèse

Présentée par :

IDER Soufian

Pour l'Obtention du Diplôme de

Doctorat En Sciences

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Thème

**Étude de la biodiversité de la flore levurienne
d'intérêt technologique isolée du lait cru de chamelle.**

Soutenue publiquement le : 15 / 09 / 2020

Devant les jurys :

Président :	Professeur HEDDADJI Miloud	Université Oran 1 Ahmed Ben Bella
Directeur de thèse :	Professeur KIHAL Mebrouk	Université Oran 1 Ahmed Ben Bella
Co-directeur de thèse :	Professeur DRIDER Djamel	Université de Lille France
Examineurs :	Professeur BOUDJEMAA Abdallah	Université de USTO Med Boudiaf Oran
	Professeur CHIBANI Abdelwaheb	Université de Mostaganem
	Professeur BENMECHERNE Z	Université Oran 1 Ahmed Ben Bella

2019-2020

Remerciement

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été effectué, en grande partie, dans le Laboratoire microbiologie appliquée de l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, et dirigé par le professeur Kihal Mebrouk, à qui j'exprime ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche et d'avoir mis à ma disposition tous les produits et matériaux nécessaires à la réalisation de ce travail. Merci pour son enthousiasme et son intérêt pour ce projet. J'ai beaucoup appris auprès de lui et de son équipe en bénéficiant de sa compétence et de sa patience contagieuse pour la recherche.

Il m'est très agréable d'adresser mes sincères remerciements au Professeur Drider Djamel, de l'université de Lille, qui m'a accueilli au sein de son équipe de recherche et qui a accepté de diriger une grande partie de ce projet de thèse, j'ai beaucoup appris de ses judicieux conseils, et son orientation, sans son aide j'aurais sans doute du mal à accomplir cette mission.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury :
Monsieur le Professeur Heddadji Miloud qui a accepté d'orchestrer le débat en tant que président de ce jury de thèse,
Le Professeur Boudjema Abdellah de l'université de l'USTO Oran, le Professeur Chibani Abdelwahad de l'université de Mostaganem et le Professeur Benmechernene Zineb de l'université Oran 1, d'avoir accepté la lourde charge d'examiner ce travail et de nous honorer par leur présence.

Je tiens à remercier infiniment l'homme des moments difficiles, Belguesmia Yanath, qui a contribué énormément à la réussite de cette thèse et ce dès notre première rencontre lors de mon stage à l'institut charlle violette, grâce à son esprit ambitieux et joyeux au même temps,

ainsi que pour sa générosité dans le partage de ses idées scientifiques, avec cette intelligence vous méritez le grade de chercheur d'excellence, que Dieu vous aide pour réaliser vos rêves et objectifs.

Je souhaite remercier également Dr. Françoise Coucheney, Maître de Conférences à l'université de Lille pour m'avoir confié sa paillasse ainsi que l'accès total aux réactifs de biologie moléculaire nécessaires, ses idées pertinentes et sa patience mon beaucoup aidé à comprendre la biologie moléculaire des levures.

Je remercie aussi tous mes collègues du bureau C324 (Mohammed, Rabia, Nacim, Nuria, Quentin, Hassan, et bien d'autres) pour leur bonne humeur dans cette salle, et même ailleurs. Ce qui m'a permis d'accomplir aisément ma mission de stage et d'avoir au même temps des bons souvenirs.

Bien sûr sans oublier mes collègues du laboratoire de microbiologie appliquée « LMA », (Islam, Faïza, Samira, Atika, Aïcha, Yanis, et bien d'autres), pour leur soutien et le partage des moments difficiles, et l'agréable ambiance de travail qu'ils ont su installer.

أحمد الله الذي بنعمته تتم الصالحات. والذي ألهمني الصبر والحكمة إتمام هذه المذكرة. ربي كما علمتني صالحا إستخدمني

صالحا

Dédicaces

C'est avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie mon travail à ma petite famille qui m'a encouragé et soutenu durant tout mon parcours universitaire :

À mes chers parents ma raison de vivre dans ce monde ;

À ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, qui a toujours été derrière moi pour m'encourager à poursuivre mes études, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices qu'elle a consentis, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mon éternelle gratitude.

À mon père, qui m'a soutenu dans le moindre souci durant ce travail et qui m'a remotivé lors de mes moments de doutes. À mon père, qui m'a appris que l'on peut toujours faire mieux. J'espère que vous retrouverez l'image ici les valeurs nobles et l'éducation que vous m'avez inculqué, à l'issue de ces longues années de sacrifices, merci pour tout.

À mon aimable femme qui ma soutenue et encouragée dans les moments difficiles et bien sûr à mon fils Youcef qui est mon porte bonheur et que je vois dans lui la joie de ma vie.

À mon chers frère Walid et mes chères sœurs Aicha et Samah qui m'ont beaucoup aidé et soutenu dans les moments difficiles. Ce travail n'aurait pas été le même sans vous. Merci du plus profond de mon cœur. Vous êtes les meilleurs frères et sœurs qu'une personne puisse avoir.

Table des matières

Remerciement	I
Dédicaces.....	III
Table des matières	IV
المخلص	VII
Résumé.....	VIII
Abstract	IX
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures	XI
Liste d'abréviations	XII
<i>Introduction générale</i>	2
<i>Synthèse bibliographique</i>	2
<i>Chapitre 1 : Écosystème du lait de chamelle</i>	3
1 Généralités sur les chameaux	3
1.1 Taxonomie des chameaux	3
1.2 L'effectif et la répartition géographique des grands camélidés dans le monde.....	5
1.2.1 L'effectif et la répartition des races des dromadaires Algériens.....	7
2 Le potentiel du lait de chamelle	9
2.1 La production du lait du dromadaire en Algérie	9
2.1.1 Les facteurs influençant sur la production laitière	10
2.2 Paramètres physico-chimiques et organoleptiques	11
2.2.1 Composition chimique et biochimique	11
2.2.1.1 Les protéines.....	12
2.2.1.2 La matière grasse.....	12
2.2.1.3 Les sels minéraux	13
2.2.1.4 Les vitamines.....	13
2.2.1.5 Les sucres	14
2.3 La microflore d'intérêt du lait de chameaux et ses dérivés	14
2.3.1 Les bactéries lactiques du lait de chamelle	14
2.3.2 La microflore levurienne du lait de chamelle et ses dérivés	16
2.3.2.1 La diversité au sein du lait cru de chamelle.....	16
2.3.2.2 La diversité au sein du lait de chamelle fermenté	18
<i>Chapitre 2 : Généralités sur les levures</i>	22
1 La taxonomie des levures :	22
2 La génétique des levures :	24
3 L'identification moléculaire des levures :	26

Chapitre 3 : Applications biotechnologies des levures	29
1 Levures comme source de production enzymatique	29
1.1 Protéase	29
1.2 Lipase	30
1.3 Autres enzymes	32
2 Probiotiques	34
2.1 Histoire des probiotiques	34
2.2 Propriétés des probiotique	35
2.3 Microorganismes probiotiques	36
2.3.1 Levures probiotiques	38
2.3.1.1 Effet antihypertenseur des levures	42
2.3.1.2 Effet antioxydant des levures	43
3 Mécanismes antagonistes	44
3.1 La concurrence pour les nutriments	44
3.2 L'inhibition par contact	45
3.3 Les changements physicochimiques et l'effet de fortes concentrations d'éthanol	45
3.4 La sécrétion de composés inhibiteurs	46
3.4.1 Les micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens	48
A. <i>Kocuria rhizophila</i>	48
3.4.2 Métabolites inhibiteurs selon la source microbienne	48
3.4.2.1 Métabolites inhibiteurs d'origines bactérien	49
A. Bactériocines	49
3.4.2.2 Métabolites inhibiteurs d'origines levuriens	54
A. Mycocines	54
B. Métabolites antibactériens	56
4 Les levures antagonistes et leurs applications :.....	58
5 Objectifs de la thèse	60
Résultats et discussion.....	62
Publication 1	63
Impact de la saisonnalité et des conditions environnementales sur la diversité des levures issues du lait de chamelle collecté en Algérie	63
Publication 2	80
The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from <i>Trichosporon asahii</i> ICVY021, found in camel milk's, inhibits <i>Kocuria rhizophila</i>.....	80
Autres résultats.....	107
1. Identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF	108
1.1. Méthodologie.....	108
1.2. Résultats et discussions.....	110
2. Activités technologiques des levures dominantes	112

2.1. Méthodologie.....	112
a. La thermotolérance et la thermorésistance.....	112
<i>b. Pouvoir fermentaire du lait de chamelle cru.....</i>	<i>112</i>
<input type="checkbox"/> Mesure de pH et acidité dornic après fermentation	112
<i>c. Activité protéolytique</i>	<i>113</i>
<i>d. Activité lipolytique</i>	<i>113</i>
<i>e. Activité antioxydante.....</i>	<i>113</i>
2.2. Résultats et discussions.....	114
<i>a. La thermotolérance et la thermorésistance</i>	<i>114</i>
<i>a. Pouvoir fermentaire du lait cru de chamelle.....</i>	<i>114</i>
<i>b. Criblage de l'activité lytique extracellulaire des souches de levures</i>	<i>117</i>
<i>c. L'activité antioxydante de la fraction du lactosérum</i>	<i>119</i>
<i>Discussion générale</i>	121
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	127
<i>Références bibliographiques</i>	130

المخلص

كان الغرض من هذه الرسالة هو عزل الخمائر من الأوساط الحيوية الجزائرية وتوصيف السلالات ذات الخصائص التكنولوجية المثيرة للاهتمام. لهذا، كان النطاق الحيوي الذي اخترناه لهذه الدراسة هو حليب الناقة الخام، وقد اعتمد هذا الاختيار على خصوصية هذا النظام البيئي بالإضافة إلى نقص البيانات حول تنوع الخمائر في حليب الناقة الخام. أولاً، كانت هذه الدراسة موضوع توصيف للتنوع البيولوجي للخمائر الموجودة في حليب الناقة الخام الذي تم جمعه في الجزائر في الولايات التالية: غرداية، بشار، البيض، جلفة و بسكرة. أوضحت نتائج هذه الدراسة أن عدد الخمائر يقدر بـ $10^2 \times 3.55$ وحدة تكوين مستعمرة في مل⁻¹، ويحد أقصى $10^2 \times 6.3$ وحدة تكوين مستعمرة في مل⁻¹. تم تصنيف الخمائر على أساس ظاهري بواسطة API 20C AUX، ثم تم تحديدها وراثياً من خلال تسلسل ADNr 26S و ITS1-5.8S-ITS2. أدت هذه التعريفات إلى إنشاء جمعية مكونة من 12 نوعاً، بما في ذلك

Trichosporon asahii, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida zeylanoides*, *Candida parapsilosis*, *Klyuveromyces marxianus* و *Candida maris*.

بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم تأثير الموسمية والظروف البيئية على هذا التنوع، والذي وجدنا أن له فرقاً كبيراً بين الخريف والربيع. حيث يكون حليب الناقة الخام أكثر إحتواء على من الخميرة خلال موسم الخريف في منطقة المناخ شبه جاف أكثر من موسم الربيع. بالإضافة إلى ذلك، من حيث التنوع، تم تحديد الغالبية العظمى من الأنواع، 11 نوعاً خلال موسم الخريف.

على عكس موسم الربيع، تم اكتشاف 6 أنواع فقط. ومع ذلك، تم العثور في كلا الموسمين على *T. asahii* بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم تأثير الموسمية والظروف البيئية على هذا التنوع، والذي وجدنا أن له فرقاً كبيراً بين الخريف والربيع. حيث يكون حليب الناقة الخام أكثر إحتواء على من الخميرة خلال موسم الخريف في منطقة المناخ شبه جاف أكثر من موسم الربيع. بالإضافة إلى ذلك، من حيث التنوع، تم تحديد الغالبية العظمى من الأنواع، 11 نوعاً خلال موسم الخريف. على عكس موسم الربيع، تم اكتشاف 6 أنواع فقط. ومع ذلك، تم العثور في كلا الموسمين على *T. asahii* بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم تأثير الموسمية والظروف البيئية على هذا التنوع، والذي وجدنا أن له فرقاً كبيراً بين الخريف والربيع. حيث يكون حليب الناقة الخام أكثر إحتواء على من الخميرة خلال موسم الخريف في منطقة المناخ شبه جاف أكثر من موسم الربيع. بالإضافة إلى ذلك، من حيث التنوع، تم تحديد الغالبية العظمى من الأنواع، 11 نوعاً خلال موسم الخريف.

ركزت هذه الدراسة أيضاً على الخواص التكنولوجية للخمائر، وخاصة تضاد الخمائر تجاه طيف واسع من الكائنات الحية الدقيقة بما في ذلك الفطريات والبكتيريا إيجابية الجرام والبكتيريا السلبية الجرام. فقد وجدة هذه القدرة فقط في سلالة *Trichosporon asahii* ICVY021 ، مقابل البكتيريا المستهدفة *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 ، بفضل إنتاج الببتيد المضاد للبكتيريا ، والذي أطلقنا عليه اسم P16 / Oranicine ، منها تم تحديد الطبيعة باستخدام تقنية LC-MS / MS. وكان تسلسل الأحماض الأمينية الجزئية لهذا الببتيد هو PPFPK و CTHV (L / I) (K / Q) أو TCHV (L / I) (K / Q). (I) علاوة على ذلك، يعتقد أن هذا الببتيد يتداخل مع آلية انقسام الخلايا.

من المثير للاهتمام ملاحظة سلامة *T. asahii* ، لأنها لم تظهر أي نشاط انحلال الدم أو أي تأثيرات سمية للخلايا ضد خلايا حقيقيات النوى Caco-2 وأخيراً، كانت *T. asahii* ICVY021 حساسة لمركبات الأزول المضادة للفطريات ، ولكن ليس لـ 5-فلوروسيتوزين و anidulafungin.

على حد علمنا، كانت دراستنا هي الوحيدة التي أثبتت أن *T. asahii* المنقولة بالغذاء يمكن أن تفرز الببتيد المضاد للبكتيريا مع طيف ضيق للغاية.

الكلمات المفتاحية: الخمائر، الحليب، الناقة، الجزائر، *T. asahii*، التعريف الجزيئي، العداء، الببتيد المضاد للبكتيريا، السمية الخلوية.

Résumé

L'objet de cette thèse avait pour but l'isolement des levures à partir de biotopes algériens et la caractérisation des souches qui possèdent des propriétés technologiques intéressantes. Pour cela, le biotope que nous avons choisi pour cette étude était le lait cru de chamelle, ce choix a été basé sur la particularité de cet écosystème ainsi que le manque des données sur la diversité des levures dans le lait cru de chamelle.

Eu premier lieu, cette étude, a fait l'objet d'une caractérisation de la biodiversité de la microflore levurienne hébergée au sein du lait cru de chamelle collecté en Algérie, dans les wilayas de Ghardaïa, Béchar, El Bayadh, Djelfa et Biskra. Les résultats de cette étude ont révélé que le nombre de levures a été estimé à $3,55 \times 10^2$ UFC mL⁻¹, avec un maximum de $6,3 \times 10^2$ UFC mL⁻¹. Les levures ont été classées phénotypiquement par API 20C AUX, puis identifiées génétiquement par séquençage de l'ADNr 26S et ITS1-5.8S-ITS2. Ces identifications ont abouti à constituer un contingent de 12 espèces, comprenant, *Trichosporon asahii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida zeylanoides*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus* et *Candida maris*.

De plus, l'impact de la saisonnalité et les conditions environnementales sur cette diversité, a été évalué et pour lequel nous avons constaté une différence significative entre l'automne et le printemps. Où le lait cru de chamelle est plus colonisé par les levures au cours de la saison d'automne dans la région à climat semi-aride, qu'au cours de la saison printemps. En outre, en termes de diversité la grande majorité des espèces, 11 espèces, ont été identifiées pendant la saison d'automne. A l'inverse de la saison du printemps où seules 6 espèces ont été retrouvées. Cependant, les espèces *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* et *C. zeylanoides* ont été isolées au cours des deux saisons. Il est à noter que d'après les données bibliographiques aucune étude antérieure sur la diversité des levures du lait cru de chamelle, n'a pu identifier les espèces suivantes : *Trichosporon asahii*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica* et *Pichia fermentans*.

Cette étude a également porté sur les propriétés technologiques des levures, particulièrement l'antagonisme des levures envers un large spectre de microorganisme incluant des champignons, des bactéries Gram-positifs et des bactéries Gram-négatifs. Cela nous a conduit à caractériser cette capacité antagoniste seulement chez la souche *Trichosporon asahii* ICVY021, vis-à-vis de la bactérie cible *Kocuria rhizophila* CIP 53.45, grâce à la production d'un peptide antibactérien, que nous avons dénommé P16 / Oranicine, dont la nature a été identifiée à l'aide de la technique LC-MS/MS. La séquence partielle d'acides aminés de ce peptide était PPFPK et CTHV (L / I) (K / Q) ou TCHV (L / I) (K / Q). de plus, nous supposons que ce peptide entrave le mécanisme de division cellulaire.

Il est intéressant également de signaler l'innocuité de *T. asahii*, car elle n'a montré aucune activité hémolytique ni aucun effet de cytotoxicité contre les cellules eucaryotes Caco-2. Enfin, *T. asahii* ICVY021 était sensible aux composés antifongiques azolés, mais pas à la 5-fluorocytosine et à l'anidulafungine.

À notre connaissance, notre étude est la seule qui a démontré qu'une souche de *T. asahii* d'origine alimentaire pourrait sécréter un peptide antibactérien avec un spectre très étroit.

Mots clés : Levures, lait, chamelle, Algérie, *T. asahii*, identification moléculaire, antagonisme, peptide antibactérien, cytotoxicité.

Abstract

The purpose of this thesis was to isolate yeasts from Algerian biotopes and characterize strains that have interesting technological properties. For this, the biotope we chose for this study was raw camel milk, this choice was based on the peculiarity of this ecosystem as well as the lack of data on the diversity of yeasts in raw camel milk.

This study focused on the characterization of the biodiversity of the yeast microflora hosted in raw camel milk collected in Algeria in the wilayas of Ghardaia, Bechar, El Bayadh, Djelfa et Biskra. The results of this study revealed that the number of yeasts was estimated at 3.55×10^2 CFU mL⁻¹, with a maximum of 6.3×10^2 CFU mL⁻¹. The yeasts were classified phenotypically by API 20C AUX, then genetically identified by sequencing the 26S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2. These identifications led to the creation of a contingent of 12 species, including, *Trichosporon asahii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica*, *Clavispora lusitanae*, *Candida zeylanoides*, *Candida parapsilosis*, *Klyuveromyces marxianus* et *Candida maris*.

In addition, the impact of seasonality and environmental conditions on this diversity was assessed, for which we found a significant difference between autumn and spring. Raw camel milk is more colonized by yeasts during the autumn season in the semi-arid climate region than during the spring season. In addition, in terms of diversity, the vast majority of species, 11 species, were identified during the autumn season. Conversely to the spring season when only 6 species were encountered. However, *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* and *C. zeylanoides* were found in both seasons. It should be noted that, according to the bibliographic data, no previous studies on the diversity of yeasts in raw camel milk have been able to identify the following species: *Trichosporon asahii*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica* and *Pichia fermentans*.

This study also focused on the technological properties of yeasts, particularly the antagonism of yeasts towards a broad spectrum of microorganisms including fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria. This has led us to characterize this capacity only in the *Trichosporon asahii* ICVY021 strain, against only one target bacteria *Kocuria rhizophila* CIP 53.45, due to the production of an antibacterial peptide, which has been called P16 / Oranicine. This peptide was studied using the LC-MS / MS technique, and its partial amino acid sequence was PPFPK and CTHV (L / I) (K / Q) or TCHV (L / I) (K / Q). furthermore, this peptide is believed to interfere with the cell division mechanism.

It is interesting to note the safety of *T. asahii*, as it did not show any hemolytic activity or any cytotoxicity effect against eukaryotic Caco-2 cells. Finally, *T. asahii* ICVY021 was sensitive to azole antifungal compounds, but not to 5-fluorocytosine and anidulafungin.

To our knowledge, our study is the only one which has demonstrated that food-borne *T. asahii* could secrete an antibacterial peptide with a very narrow spectrum.

Key words: Yeast, milk, camel, Algeria, *T. asahii*, molecular identification, antagonism, antibacterial peptide, cytotoxicity.

Liste des tableaux

Tableau 1 : l'effectif de la population camline dans le monde.	6
Tableau 2 : L'evolution de l'effectif de la polupalion des domadaires en Algérie.	7
Tableau 3 : Les concentrations moyennes (mg / kg) de vitamines de lait de dromadaire, de vache, et le lait maternel.	13
Tableau 4 : Les espèces de levures les plus utilisées en tant que probiotique.	41
Tableau 5 : Utilisation de levures antagonistes comme bio-conservateurs des produits alimentaires et bio-contrôleurs des maladies post-récolte des fruits et grains.	59
Tableau 6 : Résultats d'identification des souches de levures avec le MS/MALDI-TOF, couleur verte : excellente identification à l'ordre d'espèce ; en jaune : excellente à l'ordre du genre ; rouge : identification non fiable.	110
Tableau 7 : caractéristiques technologiques des levures isolées du lait de chamelle	115

Liste des figures

Figure 1: La distribution et la diversité des races camelines dans le monde (% signalé des races).	6
Figure 2 : La répartition géographique des races des grands camélidés dans le monde.	8
Figure 3 : La part en (%) de chaque espèce dans la production laitière nationale.	9
Figure 4 : schéma en rayon du soleil montrant l'occurrence et la diversité des levures dans le lait de chamelle, cru et fermenté.	21
Figure 5 : Un arbre phylogénétique montrant la relation entre différentes espèces fongiques qui appartient aux trois embranchements du règne fongique.....	25
Figure 6 : schéma représentatif de l'amplification de la région D1 / D2 du gène 26S de l'ADNr et ses amorces, selon le concept de code à barres ADN.....	28
Figure 7 : Traitement de plusieurs maladies par la levure probiotique <i>Saccharomyces boulardii</i>	40
Figure 8 : Les sept groupes d'antibiotiques peptidiques et leur nature et structure.	47
Figure 9 : la structure représentative de Nisine.....	52
Figure 10 : Schéma de la classification original des bactériocines des Gram positifs.	53
Figure 11 : schéma récapitulatif des étapes de l'identification des levures par la technique de la spectrométrie de masse de type Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF).....	109
Figure 12 : resultats des aspects du lait de chamelle fermenté avec les souches pures de levures	117
Figure 13 : Images représentent l'action des enzymes lytiques extracellulaires des souches de levures	118

Liste d'abréviations

Acronyme	Description
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AMP	antimicrobial peptides
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNdb	Acide ribonucléique double brans
ATCC	American type culture collection
BCA	Biological Control Agent
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BL	Bactéries Lactiques
CCK-8	Counting Kit-8
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CDI	Contact Dependante Inhibition
CID	Collision Induced Dissociations
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
D°	degré de l'acidité dornic
DO	Densité Optique
DPPH	diphényl-picryl-hydrazyle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECA 1	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EDTA	Acide Éthylène Diamine Tétracétique
FAO	Food and Agriculture Organization
FBS	Fœtus Bovin Serum
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
GI	Gastro-Intestinal
GSH	Glutathion
ICVY	Institut Charlle Viollette Yeast
ITS	Internal transcribed spacer
K1	Kiler 1
LSU	Large Sub-Unite
LC / MS	Liquid chromatography / Mass spectrometry
MS/MALDI-TOF	Mass spectrometry / Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight
MET	Microscopie Electronique à Transmission
OMS	Organization Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate-buffered saline
RAT	Riz Agar Tween
Rep-PCR	<i>Repetitive-element-palindromic-</i> polymerase chain reaction
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ScV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Virus
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
SSU	Small Sub-Unit
TAG	Triglycérides
TGI	Tractus Gastro-Intestinal
UNU	United Nations University
UFC	Unités Formant Colonies
YEPG	Yeast Extract Peptone Glucose
ZbV	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> Virus

Introduction générale

Même si les bactéries représentent les cibles les plus étudiées en microbiologie alimentaire (pathogènes, cultures starter, probiotiques, production de composés nocifs ou positifs), la date officielle de naissance de la microbiologie alimentaire comme science remonte au milieu du 19^{ème} siècle, quand Pasteur étudie la fermentation alcoolique, un processus exécuté par des levures. Successivement, les levures ont été largement étudiées comme positives (cultures starter) ou microorganismes négatifs (phéromones dans le vin, les légumes, etc., pathogènes comme *Candida albicans*). Au cours de la dernière décennie, il y a eu un intérêt croissant pour la potentialité des levures et / ou leurs éventuelles implications positives ou négatives en microbiologie alimentaire.

L'isolement et la caractérisation des levures non conventionnelles d'origine alimentaire et leurs applications en tant qu'agents biopréservateurs sont peu étudiés. Le lait de chamelle a récemment été ciblé comme source potentielle de levures non conventionnelles autochtones et a dévoilé la présence de diverses espèces. Qui sont généralement des organismes opportunistes largement distribués dans la nature (Colombo *et al.*, 2011), mais leur présence dans le microbiome humain semble limitée (Mariné *et al.*, 2015). Ces organismes de type levure basidiomycètes et ascomycètes peuvent être trouvés dans différentes niches écologiques, y compris la peau et les intestins d'individus en bonne santé (Cho *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011), les produits laitiers comme les levures d'altération (Garnier *et al.*, 2017), la soupe molle de churupi, les aliments fermentés indiens et le lait de chamelle (Rai *et al.* 2016; Abdelgadir *et al.* 2008; Lavoie *et al.* 2012; Lore *et al.* 2005; Njage *et al.* 2011), indiquant leurs capacités d'adaptation et à prospérer dans diverses niches d'accueil et environnementales. Actuellement, la détérioration fongique est considérée comme une préoccupation majeure pour le secteur industriel et les scientifiques, et cause entre 5% et 10% de pertes dans la production alimentaire mondiale (Garnier *et al.*, 2017). La présence de ces microorganismes dans les produits laitiers et les produits dérivés pourrait entraîner des effets néfastes tels que la croissance visible de champignons ou la production de métabolites indésirables provoquant une détérioration organoleptique, qui représentent un danger pour la sécurité du consommateur (Hymery *et al.*, 2014; Ledenbach et Marshall, 2010). Récemment, l'approche de la bioconservation en utilisant des microorganismes antagonistes ou leurs métabolites antimicrobiens, est devenue une alternative pour gérer / contrôler le développement des microorganismes d'altération ainsi que des pathogènes d'origine alimentaire (Garnier *et al.* 2017).

Afin d'identifier de tels microorganismes antagonistes, le choix de l'échantillon ou de la niche est crucial. Le lait de chamelle semble être un écosystème idéal, car les conditions de

Introduction générale

vie drastique de la chamelle ainsi que sa physiologie offrent un environnement adéquat pour le développement de microorganismes robustes.

De fait, on retrouve plusieurs études récentes s'intéressant à la recherche de bactéries lactiques à caractères antagoniste issues du lait de chamelle (Benmechernene *et al.* 2013; Bellil *et al.* 2018; Zarour *et al.* 2018) et/ou dotées d'autres fonctionnalités technologiques.

Toutefois les levures font l'objet d'un nombre d'études et de données très modeste dans ce contexte, malgré l'existence d'autres travaux qui ont pu mettre en évidence des levures antagonistes de substrats autres que le lait de chamelle (Golubev 2006; Hatoum *et al.* 2013; Naimah *et al.* 2018).

Ce projet de thèse s'inscrit dans cette optique et pour lequel nous avons choisi le lait cru de chamelle Algérien comme écosystème type qui peut contenir des souches de levures antagonistes.

Pour ce faire, les objectifs scientifiques suivants ont été définis :

- ✓ L'étude et le décryptage de la microflore levurienne du lait de chamelle.
- ✓ La maîtrise des facteurs influençant la diversité des levures du lait de chamelle
- ✓ Le criblage des capacités antagonistes de ces levures.
- ✓ L'utilisation de ces levures antagonistes à des fins biotechnologiques.

Le manuscrit produit ici se présente de la manière suivante :

La première partie, constitue une étude bibliographique divisée en trois chapitres distincts ; le premier rapporte des données générales sur le lait de chamelle en Algérie ; le deuxième portera sur la description génotypique des levures ; le troisième sur l'application biotechnologique des levures.

La deuxième partie est consacrée aux matériels et aux protocoles expérimentaux mis en place pour la réalisation de ce travail.

La troisième partie présente et discute l'ensemble des résultats obtenus à la suite de cette étude, en utilisant les articles publiés sur la base de ces résultats.

Enfin une conclusion générale, en envisageant les perspectives possibles à la poursuite de ce travail, sera présentée suivie de l'énumération des références bibliographiques utilisées.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Écosystème du lait de chamelle

1 Généralités sur les chameaux

Les chameaux soutiennent la survie de millions de personnes dans les régions arides et semi-arides du monde. Par son comportement alimentaire, le chameau pâture de manière à préserver son milieu écologique (Chehema 2004). Il est utilisé comme animal de bât pour transporter jusqu'à 600 kg sur le dos, dans l'équitation et également comme animal de tirage d'eau (Park *et al.* 2006).

Les chameaux possèdent des capacités remarquables pour exploiter des ressources très limitées. En effet ces animaux sont extrêmement bien adaptés à la vie dans des conditions difficiles en climats chauds ou dans les régions froides et arides telles que les déserts gelés où l'eau est souvent rare. Ils peuvent même s'adapter aux environnements froids et au manque relatif d'oxygène (Cockrill 1985). De plus, ils fournissent du lait presque toute l'année en quantités beaucoup plus importantes que les autres animaux vivant dans les mêmes conditions (Park *et al.* 2006). En outre, ils fournissent de la viande, leurs poils sont utilisés dans la confection de vêtements et de tentes et leur peau dans la fabrication des chaussures, des ceintures...etc (Siboukeur 2007). Cependant, le lait reste la principale ressource obtenue à partir d'un troupeau de chameaux (Dahl et Hjort 1979). Malgré son intérêt incontestable dans les zones arides, le chameau reste une espèce relativement marginalisée.

1.1 Taxonomie des chameaux

Tous les chameaux appartiennent à l'ordre des Artiodactyla (ongulés à doigts égaux) ; sous-ordre : *Tylopoda* (pattes) ; famille : *Camelidae* qui comprend actuellement, 3 genres et 7 espèces. Le genre de l'ancien monde est le *Camelus*, avec deux espèces *C. bactrianus* (à deux bosses) et *C. dromedarius* (à une bosse). Les genres du nouveau monde comprennent le Lama, avec trois espèces, et le genre *Vicugna* avec une seule espèce (Mason 1979).

Selon (Konuspayeva 2007) la taxonomie actuelle est la suivante :

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Mammalia</i>
Sous-classe	<i>Placentalia</i>
Ordre	<i>Artiodactyla</i>
Sous-ordre des	<i>Tylopoda</i>
Famille	<i>Camelidae</i>

Genre *Camelus*



Camelus dromedarius



Camelus bactrianus



Camelus ferus

Genre *Lama*



Lama glama (lama)



Lama guanicoe (guanaco)



Lama pacos (alpaga ou alpaca)

Genre *Vicugna*



Vicugna vicugna (vigogne)

1.2 L'effectif et la répartition géographique des grands camélidés dans le monde

Selon Faye (1997) les populations camelines sont répertoriées dans 35 pays. Elles se retrouvent un peu partout dans le monde et leur aire de répartition géographique est très vaste. Celle-ci se situe au niveau des zones tropicales et subtropicales et s'étend des régions arides et semi-arides du nord de l'Afrique (Mauritanie) jusqu'au nord-ouest du continent asiatique (Chine) (Siboukeur 2007). Cela bien entendu est associé aux caractéristiques climatiques du milieu, compte tenu de l'adaptabilité remarquable de chaque espèce aux conditions d'aridité.

Le chameau dromadaire, dérive du terme grecque « dromados » qui veut dire course, désigne le chameau à une seule bosse. C'est une espèce qui habite les zones chaudes et sèches de l'Afrique du Nord, de l'Éthiopie, du Proche-Orient et de l'Asie centrale occidentale (Simpson 1945). Le chameau dromadaire serait originaire d'Amérique du Nord, où le plus ancien fossile de *Camelidae* a été trouvé, d'où il aurait rejoint l'Asie et l'Afrique il y a des millions d'années, suite aux glaciations qui sévirent dans pratiquement la quasi-totalité de l'hémisphère nord de la planète durant l'ère tertiaire (Ripinsky 1983).

La domestication du dromadaire a commencé il y a environ 3 000 à 4 000 ans avant notre ère dans le sud de l'Arabie, la région actuelle du Yémen et d'Oman et a ensuite été introduit en Afrique du Nord et de l'Est, en Perse et en Inde (Schwartz et Dioli 1992). Le chameau de Bactriane (*Camelus bactrianus*) est nommé ainsi en référence à sa zone de répartition la « Baktriana », située dans le nord de l'Afghanistan d'où ce type de chameau serait originaire (Wei 1980). Cette espèce est légèrement plus petite que le dromadaire, elle est plus trapue, plus courte sur pattes, possède deux bosses distinctives et sa laine est de bonne qualité. Cette espèce ne supporte pas la moindre chaleur, c'est pour cela qu'elle occupe les déserts froids des régions méridionales de l'ancienne union soviétique, de la Mongolie, de l'Asie centrale et orientale et de la Chine (Wilson 1984).

Il est difficile de connaître avec exactitude la population cameline mondiale, du fait de l'absence de vaccination obligatoire et de la nature des écosystèmes dans lesquels elle évolue. Les chiffres proposés par la FAO sous-estiment sans doute sa population réelle. Selon les statistiques de la FAO (FAO 2008b; FAOstat 2001), la population cameline a connu une évolution importante dans ses effectifs. Ainsi en 2001 elle comptait environ 19 millions de têtes alors que en 2008 la population cameline atteint les 24 millions. Selon les statistiques les plus

récentes de FAOstat (2014), en 2014 les effectifs ont connu une légère évolution à 27,8 millions de têtes, avec une grande majorité (80%) constituée des dromadaires qui vivent dans les régions arides du nord et du nord-est de l'Afrique. Pourtant, en terme de diversité, le nombre des races camelines en Asie est plus élevé qu'en Afrique (Fig. 1) (Rischkowsky et Pilling 2008). Les dromadaires sont concentrés principalement en Somalie, 1er producteur mondiale avec 7,15 millions de têtes soit 30% de la production mondiale, suivie du Soudan, avec 20%, et du Kenya avec 12% (Tab.1).





Figure 1 : La distribution et la diversité des races camelines dans le monde (% signalé des races locales de l'espèce,  Bactriane  dromadaire).

Tableau 1 : l'effectif de la population camline dans le monde selon FAOstat (2014).

Position	Pays	Population (têtes)
1	Somalie	7150000.0
2	Soudan	4792000.0
3	Kenya	2937262.0
4	Niger	1720185.0
5	Tchad	1550000.0
6	Mauritanie	1525000.0
7	Ethiopie	1164100.0
8	Pakistan	1015000.0
9	Mali	998500.0
10	Yémen	460000.0

1.2.1 L'effectif et la répartition des races des dromadaires Algériens

L'Algérie, occupe la première place en Afrique du nord en terme d'effectif des dromadaires (FAOstat 2001). Cependant elle se positionne à la 14^{ème} place avec une production de 354 465 de têtes soit 2% de la production mondiale selon (FAOstat 2014). Dès lors, l'élevage des dromadaires a connu une évolution constante mais faible (Tab. 2).

Tableau 2 : L'évolution de l'effectif de la population des dromadaires en Algérie selon (FAOstat 2018).

Année	2015	2016	2017	2018
Population (Par tête)	362265	379094	381882	417322

Les classifications des dromadaires sont différentes, qu'elles soient basées soit sur la couleur dominante de la robe, le relief, sur l'origine tribale, ou selon le mode d'utilisation. Dans ce dernier cas les dromadaires peuvent être classés en quatre grandes catégories : les chameaux de viande, de produits laitiers, à double usage et les chameaux de course (Wardeh 2004). Les différentes races rencontrées en Algérie se retrouvent aussi dans les deux autres pays d'Afrique du Nord « Maroc et Tunisie » ; il s'agit des races suivantes :

Le Sahraoui :

C'est au sein de la population mixte dite Maghrebi, assez polymorphe et présente en Égypte, au Maroc, en Algérie, en Libye et en Tunisie, que l'on retrouve la race Sahraoui (ou Saharaoui). En Algérie son territoire de répartition va du grand Erg occidental au centre du Sahara « Ghardaïa, Ouareghla » (Fig. 2). La hauteur de la bosse du mâle est en moyenne de 2 m, ce sont des individus forts et robustes. Cette race est par ailleurs une bonne laitière et s'engraisse rapidement. Il s'agit d'une race assez précoce, car les femelles peuvent être saillies dès l'âge de trois ans. Celles-ci sont qualifiées de « bonnes laitières », elles peuvent être exploitées longtemps, l'âge de la réforme peut atteindre 25 ans chez la femelle (Babelhadj *et al.* 2016).

Telli :

Le chameau de la Steppe est utilisé pour le nomadisme rapproché. On le trouve aux limites Sud dans la partie steppique du Sahara aux confins de l'Atlas (Fig. 2). C'est un animal rustique, multi-usage mais plus réputé pour le bât (Faye 2009).

L'Ouled Sidi Cheikh :

Trouvé dans la région d'Ain Safra aux frontières du nord-est de la Mauritanie, des frontières du sud-est du Maroc et des frontières du sud-ouest de l'Algérie (Fig. 2). Ils sont de couleur marron, ont un pis assez développé et sont élevés par la tribu du même nom. Ils produisent environ 2000 kg de viande par an dans des conditions naturelles de parcours et répondent bien à l'alimentation dans la station d'élevage pour l'élevage de chameaux dans la même zone. La production de lait pourrait atteindre 3500 kg / 305 jours dans de bonnes conditions d'alimentation (Wardeh 2004).

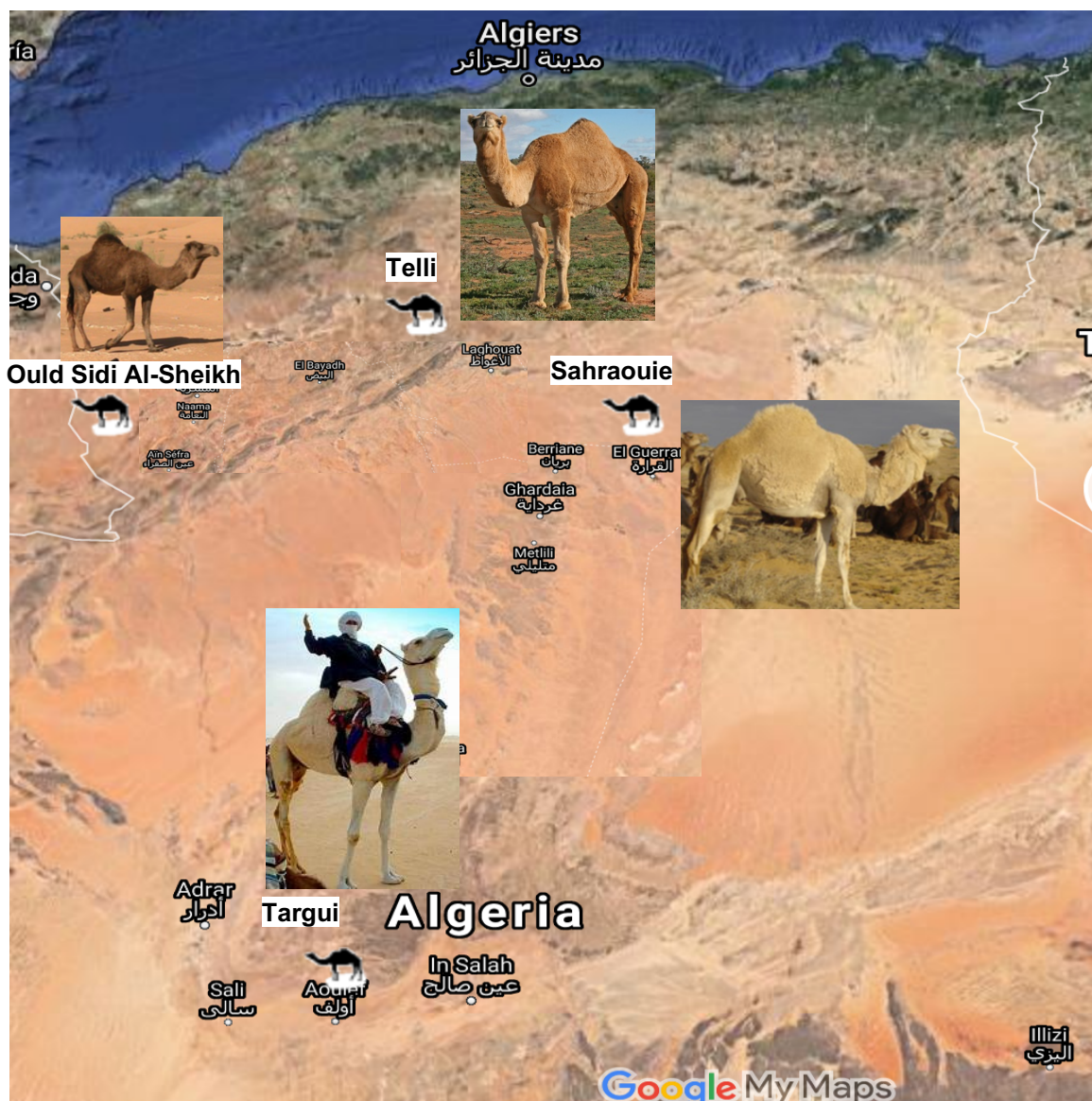


Figure 2 : La répartition géographique des races des grands camélidés dans le monde, selon Faye (2009).

Le Targui :

C'est le dromadaire des Touaregs du Nord, il s'agit d'un excellent méhari mais surtout d'un animal de selle réputé. On le trouve dans le Sahara central, le Hoggar et l'extrême Sud Algérien (Tamanrasset) (Fig. 2). On le rencontre très souvent un peu plus au nord, parce qu'il est aussi très utilisé comme reproducteur. En effet, c'est le dromadaire de course par excellence, il est très haut sur des membres fins et secs, avec une robe claire à poils très courts et fins. Il est classé parmi les types de grande taille, car il a une hauteur au garrot moyenne de 1,92 m. L'effectif de cette population emblématique d'Algérie est en nette régression (Babelhadj *et al.* 2016).

2 Le potentiel du lait de chamelle

2.1 La production du lait du dromadaire en Algérie

En Algérie, avec 73000 têtes et un quota de 12500 tonnes de lait, la chamelle laitière reste très loin derrière les autres races laitières, avec une part de la production laitière nationale de 0,6% en 2008 (FAO 2008a).

La production de lait de chamelle a connu une augmentation durant ces dernières années, mais cette dernière demeure très faible, de l'ordre de 15 % c'est-à-dire 14807 tonnes de lait de chamelle par an. Cependant par rapport à la production laitière nationale sa part a diminué à 0,48% (Fig. 3), a contrario de l'augmentation observée dans l'effectif camelin. Cela montre que ce type d'élevage est surtout orienté vers la production de viande, la production du lait étant secondaire (Chehma 2004).

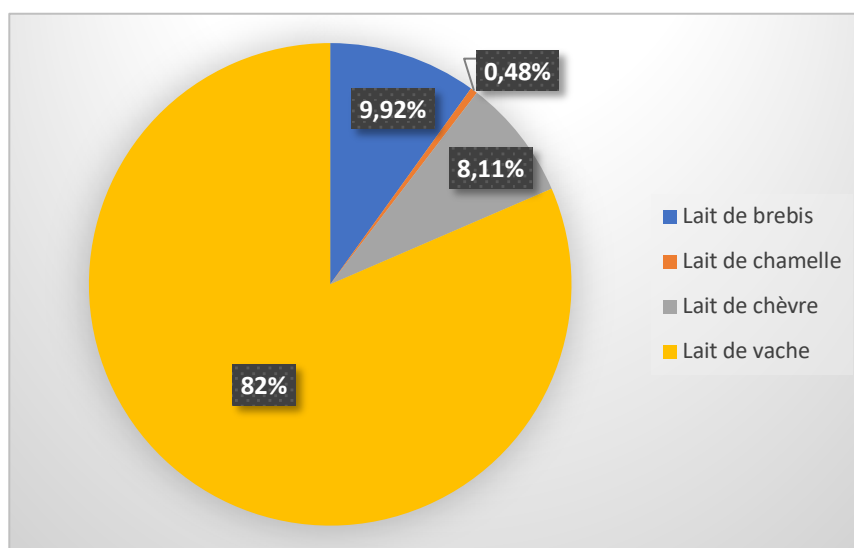


Figure 3 : La part en (%) de chaque espèce dans la production laitière nationale (selon les Données FAOstat (2018).

En revanche, des études ont démontré que la production de lait des dromadaires est supérieure à celle des bovins laitiers élevés dans les mêmes conditions climatiques arides avec des températures chaudes (Ismail et Al Mutairi 1998). Au Kenya, dans les zones de Samburu et de Rendile où les chamelles et les vaches sont élevées dans les mêmes conditions de température élevée, seulement 1-2 litres sont produits pour chaque vache alors que 4 litres le sont pour chaque chamelle (Sweet 1965; Park *et al.* 2006).

2.1.1 Les facteurs influençant sur la production laitière

La capacité des chamelles à produire du lait n'est presque pas influencée par la disponibilité ou non de l'eau. Une privation d'eau de 7 jours reste sans effet sur le niveau de production du lait (Farah 1993; Yagil *et al.* 1994). D'autres facteurs peuvent affecter le rendement des chamelles en lait : rang et stade de lactation, race, saison...etc. Toutefois, et comme pour les bovins, l'alimentation du dromadaire ainsi que le type d'élevage pratiqué restent les facteurs les plus déterminants (Ramet 1993; Wangoh *et al.* 1998).

- Les chamelles soumises à un élevage de type intensif, dont la production varie de 15 à 35 kg, avec un maximum estimé à 50 kg par chamelle et par jour selon Field (1980).
- Les dromadaires soumis à un élevage traditionnel de type extensif, c'est-à-dire reposant exclusivement sur le pâturage des parcours sahariens (Chehema 2004), la production laitière varie de 4 à 14 kg avec un maximum de 19 kg par femelle et par jour ; ce type d'élevage est pratiqué en Algérie (Siboukeur 2007). Dans ces élevages la traite des chamelles est effectuée à la main et nécessite la présence des chamelons qui aident à la descente du lait avant que la chamelle ne soit traitée (Park *et al.* 2006).
- Les variations saisonnières affectent de façon très importante le régime alimentaire du dromadaire. Ceci est dû aux variations des disponibilités fourragères et à la nature de la végétation (Longo-Hammouda *et al.* 2007).
- La fréquence de la traite ainsi que le statut sanitaire de la chamelle, influencent la quantité du lait recueilli (Faye 2004). L'étude de l'effet de la production laitière sur la composition de lait de la chamelle rapporte que la teneur en protéines était significativement plus faible dans le lait des chamelles à haut rendement que dans le lait des chamelles à faible rendement (Park *et al.* 2006).

2.2 Paramètres physico-chimiques et organoleptiques

Le lait de chamelle, qui provient d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée, doit être recueilli proprement sans contenir du colostrum (Bourgeois *et al.* 1996). Il est caractérisé d'une couleur très blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène (Sawaya *et al.* 1984b). Il peut être mousseux (El-Agamy 1994), semblable au lait de Bactriane (Indra et Erdenebaatar 1998).

Le goût de lait de chamelle est généralement doux, quand les chameaux sont nourris de fourrage vert, mais il est parfois salé due à l'alimentation à base de certains arbustes et d'herbes dans les régions arides (Indra et Erdenebaatar 1998). La disponibilité d'eau a aussi un impact sur le goût (Wangoh *et al.* 1998).

L'analyse de divers échantillons de lait de chamelle de différentes sources ont montré que leur pH s'éloigne de la neutralité par rapport à celui de vache et de l'être humain, 6,55 ; 6,68 ; 6,9 ; respectivement. Les mêmes études ont rapporté que son acidité est de l'ordre de 15° D, elle est inférieure à celle de lait de vache (18° D) mais nettement supérieure à celle du lait chez l'être humain (6°D) (El-Agamy 2006).

Comparé au lait de vache, le lait de chamelle s'acidifie très peu et lentement. Il peut être conservé longtemps sans réfrigération entre 3 jours à 30°C et 2 semaines à 7°C (Omer et Eltinay 2009). Son point de congélation se situe entre -0,57°C et -0,61°C (Wangoh *et al.* 1998), qui est inférieur à celui de lait de vache (-0,51°C à -0,56°C). La teneur élevée en lactose ou en sel dans le lait de chamelle peut contribuer à ce résultat (El-Agamy 1994).

2.2.1 Composition chimique et biochimique

La composition du lait consommé par l'homme a été largement étudiée travers le monde. Ce qui a fourni beaucoup de données dans la littérature concernent principalement le lait de vache. Des études sur le lait des autres animaux laitiers, tels-que les dromadaires, sont plutôt rares, en dépit de son intérêt nutritionnel (Konuspayeva *et al.* 2009). Il présente une grande originalité dans la composition fine et qualitative des molécules protéiques, des matières grasses et des sels minéraux.

2.2.1.1 Les protéines

Les protéines sont des molécules importantes pour les êtres vivants des zones arides. Selon la littérature, leur concentration totale dans le lait de chamelle est de $3,35 \pm 0,62$ g/100 ml (Konuspayeva *et al.* 2009).

Les caséines (α_1 , α_2 , β , et κ) sont les protéines majeures, représentant environ 70% des protéines totales dans le lait des dromadaires. Leur ratio est de 27,02 à 54,58% pour α_1 / α_2 caséines de la protéine totale ; 12,56 à 33,95% pour β -caséine, et κ -caséine d'indécelable à 8,42%. Les autres formes de protéines sont les α -lactalbumine qui se présentent en deux variantes dans le lactosérum du lait de dromadaire (Ereifej *et al.* 2011).

Une caractéristique importante du lait de chamelle, qui ressemble beaucoup plus au lait humain par rapport au lait de vache, est l'absence de β -lactoglobuline (El-Hatmi *et al.* 2007). Ce type de protéines provoque des allergies chez l'homme et leur absence dans le lait de chamelle lui confère un caractère hypoallergique par rapport au lait de vache (El-Agamy 2009).

Toutes les données révèlent que les protéines de lait de chamelle présentent un équilibre satisfaisant de la qualité des acides aminés essentiels et dépassant même les exigences de la FAO / OMS / UNU (1985) pour chaque acide aminé. Bien que les besoins quotidiens minimaux soit de 2 300 KCal pour l'Homme adulte (Podrabsky 1992). 8 tasses de lait de chamelle sont suffisants pour répondre à ces besoins en acides aminés essentiels (El-Agamy 2009).

2.2.1.2 La matière grasse

Selon la littérature, la teneur en matière grasse du lait de chamelle est de $3,82 \pm 1,08$ g /100 ml (Konuspayeva *et al.* 2009). Une analyse détaillée de la répartition des triglycérides dans le lait de dromadaire a été effectuée par (Haddad *et al.* 2011). Cette étude a révélé que 99% TAG quantifiés sont contenait au moins l'un des quatre principaux acides gras (C14 : 0, C16 : 0, C18 : 0, C18 : 1), qui représentaient pour eux seuls 74% du total des acides gras.

Le lait de chamelle est généralement considéré comme une source riche en acides gras de longue chaîne et insaturés, qui peuvent diminuer l'hyperlipidémie chez l'homme (Fukuda 2013).

2.2.1.3 Les sels minéraux

Dans le lait de chamelle, les concentrations des principaux sels minéraux sont variables, dont les concentrations moyennes (mg / 100g) sont les suivantes {114 calciums, 11 magnésiums, 59 sodiums, 156 potassiums, 55 phosphores, 0, 59 zincs, 0,005 manganèse, et 0,29 fer). Cela est attribué à la méthode d'analyse, la race, l'alimentation, le stade de lactation, et la consommation d'eau (Haddadin *et al.* 2008; Konuspaveva *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2005). Pour aider à éviter une anémie, qui est dû à une carence en fer, et prendre en charge la croissance rapide des enfants, le lait de chamelle peut être une source importante du fer (Fukuda 2013). En revanche, la faible concentration en citrate dans le lait de chamelle (128 mg/dl), par rapport au lait de vache (160 mg/dL), ce qui peut être un avantage car cela permet de renforcer l'activité antimicrobienne due à la lactoferrine (El-Agamy 2009).

2.2.1.4 Les vitamines

Le lait de chamelle est le plus riche en vitamines, par rapport au lait d'autres sources, en particulier la vitamine C, 140 mg / kg, par rapport à 13 mg / kg et 40 mg / kg dans le de vache et chez l'être humain, respectivement (Farah *et al.* 1992; Zhang *et al.* 2005). Il est aussi riche en vitamines B1, B2, B6, B12 (Fukuda 2013), ainsi qu'en niacine avec en moyenne des niveaux 3 fois plus élevés que celle présentent dans le lait bovin (Sawaya *et al.* (1984a). L'inconvénient dans la composition de lait de chamelle, est son faible taux en vitamines A et E par rapport au lait de vache et au lait maternel (El-Agamy 2009).

Tableau 3: Les concentrations moyennes (mg / kg) de vitamines de lait de dromadaire, de vache, et le lait maternel.

Vitamine	Dromadaire	Vache	Humain
A	0,21	0,28	0,55
B1 (thiamin)	0,41	0,59	0,15
B2 (riboflavin)	1,1	1,6	0,38
B3 (niacin)	0,78	0,7	1,7
B5 (pantothenic acid)	2,3	3,8	2,7
B6 (pyridoxine)	0,54	0,5	0,14
B7 (biotin)	AD	0,04	0,01
B9 (folicacid)	0,0046	0,055	0,042
B12	0,0053	0,009	0,0005
C	140	13	40
D	0,003	0,009	0,014
E	0,18	0,6	8

AD : Aucune donnée

2.2.1.5 Les sucres

Le principal glucide du lait est le lactose, Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc, qui représente 2,4 à 5,8 % dans le lait de chamelle (Konuspayeva *et al.* 2009). Avec une concentration moyenne de 4,44% (Zhang *et al.*, 2005), cette proportion est plutôt constante au cours des différents stades de lactation (Hassan *et al.* 1987; Zhang *et al.* 2005). Cependant la déshydratation, provoquée par des conditions de sécheresse, entraîne une diminution de la teneur en lactose à 2,9% (Yagil et Etzion 1980). La présence de tels oligosaccharides dans le lait sont suspectés de jouer un rôle important dans la protection contre les microorganismes pathogènes, stimulation de la croissance et / ou de l'activité métabolique des bifidobactéries, et sont des promoteurs pour le développement du système nerveux des enfants (Urashima *et al.* 2009).

2.3 La microflore d'intérêt du lait de chammelles et ses dérivés

En raison des propriétés physico-chimiques du lait de chamelle, telles que sa forte teneur en eau, son pH voisin à la neutralité et sa richesse en lactose. Il devient éminemment périssable et un milieu favorable pour l'enchaînement des réactions enzymatiques, donc rapidement colonisé par de divers microorganismes.

Ceux-ci peuvent appartenir à une flore d'altération ou à une flore positive présentant un intérêt biotechnologique. La nature de ces germes ainsi que leurs concentrations peuvent varier dans le temps et en fonction des pratiques d'élevage. Les microorganismes qui possèdent les outils adéquats pour utiliser les composés présents dans le lait, tel que le lactose, seront avantagés par rapport aux autres (Tourette *et al.* 2002).

2.3.1 Les bactéries lactiques du lait de chamelle

Traditionnellement, les bactéries lactiques (BL) ont été appelés « organismes d'acidification du lait », et souvent négativement associée à l'altération des aliments destinés à l'homme et l'animale en raison de leur fermentation (Liu *et al.* 2014). Cependant, Au cours des dernières années, les BL sont perçus de façon plus positive en tant que ferments spontanés ou en tant que starters permettant la production de produits fermentés traditionnels ou industriels plus sûrs. Beaucoup d'espèces de BL ont été isolées et identifiées à partir de lait de chamelle par différents instituts de recherche dans le monde (Liu *et al.* 2014).

Des travaux récents effectués au laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Oran1 Ahmed Ben Bella, ont mis en évidence la présence de bactéries lactiques possédant des

activités technologiques variées telles que la production de substances antimicrobiennes (Ouiddir *et al.* 2019; Bellil *et al.* 2018), la production d'exopolysaccharides (Benhoua *et al.* 2019; Zarour *et al.* 2018) et l'adaptation aux conditions de stress.

De nombreux BL sont des bactéries ayant une importance technologique telles que *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*. D'autres bactéries qui peuvent être impliquées dans le développement de la saveur, l'arôme et la couleur dans les fromages comme les staphylocoques à coagulase négative ainsi que les espèces d'*Arthrobacter*, de *Brevibacterium* et de *Corynebacterium* ont également été retrouvées dans le lait de chamelle (Aloun et Hamadache 2019).

Dans l'industrie agro-alimentaire le contrôle des microorganismes pathogènes et d'altération revêt une grande importance afin de garantir la qualité des aliments et la sécurité du consommateur. Afin d'y arriver, les alternatives aux additifs chimiques, telles que bactériocines produites par des BL, ont été utilisées. Cela ayant fait l'objet de plusieurs travaux de recherches portant sur leur utilisation en tant que bio-conservateurs dans diverses matrices alimentaires, en particulier dans l'industrie laitière (Gupta *et al.* 2020; Renye *et al.* 2019).

Dans le lait de vache des souches appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Leuconostoc* ont été isolées, et présentent des activités antagonistes avec des spectres antimicrobiens importants contre des bactéries pathogènes à Gram-positif et à Gram-négatif. L'inhibition était particulièrement remarquable pour une souche de *Lactobacillus* LBbb0141 vis-à-vis de *Listeria ivanovii* (Djadouni et Kihal 2012). Dans le lait de vache une souche d'*Enterococcus durans* E204, a été identifiée en tant que productrice d'une substance inhibitrice fortement active contre *Listeria innocua* (El Ouardy 2013). En outre cette substance antibactérienne est thermostable et conserve son activité aux températures extrêmes (même après un traitement à 121°C pendant 15 minutes) et aux variations de pH (de 2 à 10) avec cependant une activité plus élevée à pH acide.

Ces éléments ont conduit les scientifiques à porter leur intérêt sur ces bactéries et à s'intéresser à leurs métabolites et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire, mais aussi en thérapeutique humaine, en tant que nouveaux agents antimicrobiens (Martin-Visscher *et al.* 2008).

Les BL qui peuvent avoir un effet bénéfique sont communément appelés « probiotiques », c'est-à-dire, selon (FAO / OMS, 2002) « des bactéries vivantes qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (Quigley *et al.* 2013). Les probiotiques maintiennent l'équilibre du microbiote gastro-intestinal. Plusieurs probiotiques ont été isolés du lait de chamelle cru et ses dérivés (Fukuda 2013; Yasmin *et al.* 2020). Ainsi deux souches de *Lactobacillus plantarum* ont été isolé de Shmen, un beurre traditionnel algérien fait de lait de dromadaire. Ces souches sont acidotolérantes à faible pH et survivent à des concentrations forte en sels biliaire (2%) (Maurad et Meriem 2008). En outre, ces souches nt exprimé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, en réduisant leur population de 1.6 log (Anas *et al.* 2008).

Plusieurs activités bénéfiques pour la santé ont été attribuées aux BL, tels que l'activité antibactérienne (Benkerroum 2010), antihypertenseur (Saito 2008; Yamamoto 1997), antioxydante (Kudoh *et al.* 2001), antitumorale (LeBlanc *et al.* 2002), et immuno-modulatrices (Gill *et al.* 2000; LeBlanc *et al.* 2002). Ainsi par exemple, *Lactobacillus helveticus* 130B4 isolée à partir de lait fermenté de chamelle Bactriane chinoise (Quan *et al.* 2008), produit par fermentation de lait de vache écrémé un nonapeptide dérivé de k-casein. Ce peptide montre une activité inhibitrice *in vitro* contre l'enzyme de conversion I, une carboxypeptidase dipeptidyl associé à une pression artérielle élevée (Fukuda, 2013).

2.3.2 La microflore levurienne du lait de chamelle et ses dérivés

2.3.2.1 La diversité au sien du lait cru de chamelle

Selon (Mrak *et al.* 1978) "Nous nous sommes convaincus que la recherche imaginative par les écologistes des levures mènera à la découverte de nombreuses associations intéressantes supplémentaires et l'isolement de nouvelles espèces de levures." Cette vision est portée par la croissance spectaculaire du nombre d'espèces de levures connues en quelques années, passant de 341 (Lodder 1970) à 597 (Barnett *et al.* 1990).

Le lait cru est considéré comme un écosystème idéal hébergeant de nombreuses espèces de levures. Celui-ci fournit tous les nutriments et les conditions nécessaires pour la croissance de la flore fongique (Callon *et al.* 2007). Dans la plupart des cas ces levures proviennent du sol, de la litière, des aliments, de l'air et moins fréquemment à partir des machines à traire ou le pis affecté de mammite (Büchl et Seiler 2011). La nature et le nombre des levures retrouvés dans le lait cru peuvent être influencés par l'état physiologique de l'animal, ainsi que le temps,

l'alimentation et la saison (Callon *et al.* 2007; Vacheyrou *et al.* 2011). L'exposition prolongée du lait cru de chamelle à des températures ambiantes élevées ainsi que son parcours à partir de la traite jusqu'au consommateur final, ont été décrits comme des facteurs influençant l'apparition des levures (Abdurahman 2004).

Bien qu'un nombre relativement petit d'espèces de levures se retrouvent dans le lait cru, elles sont persistantes et peuvent être détectées à des niveaux relativement élevés, soit entre 10^2 – 10^4 ufc/ml (Lagneau *et al.* 1996). Toutefois, le lait de vache abritait la plus grande diversité levurienne. Ainsi Lavoie *et al.*, (2012) recense 37 espèces appartenant à 11 genres différents incluant *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Issatchenkia*, *Nakazawaea*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Trichothecium* et *Yarrowia* (Lavoie *et al.* 2012).

Concernant le lait de chamelle cru, la diversité des levures est nettement moindre que celle du lait de vache au niveau de la charge microbienne, des genres, et des espèces. Ainsi, selon (Njage *et al.* 2011) un très faible nombre de levures a été retrouvé à partir de différents laits de chamelle recueillis directement du pis (moins de 2.5 log ufc/ml). Cependant, ce nombre augmente jusqu'à 6,5 log ufc/ml au cours de l'acheminement vers le consommateur final, 24h après la traite. Dans ces conditions la diversité des levures retrouvées dans le lait cru de chamelle augmente et comprend 14 espèces parmi lesquelles nous retrouvons *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspicua*, *Trichosporon mucoides*, *Candida famata*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida lusitaniae*, *Candida krusei*, *Geotrichum klebahnii*, *Geotrichum capitatum*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii* et *Candida zeylanoides* (Fig. 4). En outre *Geotrichum pénicillium* a été également isolé à partir du lait de chamelle cru dans des échantillons lors d'une autre étude comparable (Lore *et al.* 2005).

Il est important de distinguer, parmi les espèces retrouvées dans un environnement donné, celle qui sont des composantes essentielles de la communauté de celles qui sont transitoires ou présentes fortuitement (Kurtzman *et al.* 2011). La manutention et la fermentation du lait ont une influence sur la diversité des levures qui contribuent dans la caractérisation du lait fermenté de manière spontanée (Kebede *et al.* 2007; Narvhus et Gadaga 2003).

2.3.2.2 La diversité au sein du lait de chamelle fermenté

La microflore fongique (levurienne) du lait de chamelle fermenté naturellement a fait l'objet de plus d'études par rapport à celle retrouvée dans le lait cru (Fig. 4). Cependant, peu d'informations sont disponibles concernant les levures impliquées dans la fermentation du lait de chamelle dans les zones des régions arides et semi-arides et la nature de ce processus spontané (Njage *et al.*, 2011). Cette fermentation naturelle est le résultat d'un contingent microbien principalement composé de BL. Plus largement, les levures contenues dans une large gamme de produits alimentaires africains fermentés, y compris le lait, ont été recensées et identifiées (Fleet 2007; Kebede *et al.* 2007; Narvhus et Gadaga 2003). Indiquant ainsi que ces microorganismes sont capables de proliférer durant les processus de fermentation dans la matrice lait (Pereira-Dias *et al.* 2000; Suzzi *et al.* 2003) et d'interagir positivement avec les BL (Gadaga *et al.* 2001; Narvhus et Gadaga 2003). Ces interactions permettent l'obtention de différents laits fermentés ayant des caractéristiques spécifiques.

➤ **Gariss :**

Plusieurs études rapportent la présence relativement élevée de levures au cours de la fermentation du lait de chamelle cru pour produire le « Gariss » (Fig. 4). Ainsi, Abdelgadir *et al.* (2008) ont constaté que les levures étaient prédominantes dans tous les échantillons de Gariss analysés, allant de 6,05 log ufc /g jusqu'à 7,79 log ufc /g. De même le nombre de levures retrouvées était très proche dans les échantillons de Gariss obtenu à partir de troupeaux de chamelle de transhumance et nomadique, avec $6,99 \pm 0,13$ log ufc /g et $7,02 \pm 0,3$ log ufc /g, respectivement (Hassan *et al.* 2008).

Deux espèces de levures dans le Gariss ont été identifiées *Kluyveromyces marxianus* et *Issatchenkia orientalis* (Abdelgadir *et al.* 2008). Le même auteur a également souligné que la concentration moyenne de l'espèce *K. marxianus* variait de 2,08 à 6,85 ufc/g, et était plus importante que celle de l'espèce *I. orientalis* qui variait elle entre 0,94 et 4,23 ufc/g.

Les souches de *K. marxianus* isolées à partir de Gariss sont capables de métaboliser le lactose alors que *I. orientalis* en sont incapables (Abdelgadir *et al.*, 2008). Cependant, les deux espèces sont capables de métaboliser le lactate (Kurtzman et Robnett 1998). La croissance des levures dans le Gariss est donc probablement influencée positivement par les activités métaboliques des BL présentes dans le lait de chamelle (Narvhus *et al.*, 2003).

➤ **Shubat**

Les caractéristiques spécifiques des laits fermentés dépendent de leur microflore (Wouters *et al.* 2002). Cette microflore est unique et diffère selon les techniques de production et de la localisation géographique (Dewan et Tamang 2007).

Dans le Shubat (Fig. 4), un autre type de lait de chamelle fermenté spontanément, produit en chine, 4,3 à 4,7 log ufc/ml de levures ont été retrouvées (Rahman *et al.* 2009). Cette microflore fongique était composée de *K. marxianus* étant la levure dominante de la microflore avec 14% du total des isolats, suivie par *K. unispora* et *Candida ethanolica* à 8% et 2% respectivement. En outre, Rahman *et al.*, (2009) ont rapporté que *C. ethanolica* dans le Shubat n'assimile pas le nitrate, ne produit pas d'uréase et ne fermente aucun sucre. Ce qui suppose que cette espèce n'a probablement pas de fonction importante au cours de processus de la fermentation.

De manière surprenante cette étude n'a pas permis d'identifier de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Issatchenkia orientalis* dans aucun des échantillons de Shubat, ouvrant donc la voie à des études plus précises afin de définir le rôle précis des levures retrouvées (Rahman *et al.*, 2009).

➤ **Suusac :**

Le lait de chamelle fermenté traditionnellement d'origine Kenyane appelé le « Suusac », abrite la plus grande diversité fongique en termes de genres et d'espèces (Fig. 4). La moyenne du nombre de levures retrouvées, dans ce produit, varie entre $2,05 \pm 0,17$ et $3,76 \pm 0,40$ log ufc/ml selon Lore *et al.*, (2005), et de $2 \pm 1,7$ à $5,4 \pm 0,5$ log ufc/ml selon Njage *et al.*, (2011). En dépit de la concentration levurienne plus au moins faible, 175 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 21 espèces de levures dont 12 espèces sont plus fréquentes et appartiennent aux genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* et *Geotrichum* (Njage *et al.*, 2011). D'autres espèces différentes ont été recensées dans les échantillons de Lore *et al.*, (2005), comme *Candida krusei* et *Geotrichum penicillatum*. *C. krusei* était la levure dominante de microflore fongique de Suusac avec environ 50%, ce qui représente environ 20% de sa microflore totale.

Frazier et Westhoff (2003) ont rapporté que *C. krusei* est utilisée comme des cultures starter de produits laitiers pour maintenir l'activité des BL et augmenter leur longévité. Ce qui

contribue positivement dans la production Suusac, quoique le mécanisme précis de ce phénomène n'est pas encore résolu. En outre, *C. krusei* est reconnue pour le rôle essentiel qu'elle joue dans le développement de la saveur pendant la fermentation des fèves de cacao, en raison de son activité protéolytique (Jay *et al.* 2005). Il est tout à fait possible que cette levure joue un rôle similaire dans le développement de la saveur du Suusac (Lore *et al.*, 2005).

Généralement les levures appartenant au genre *Rhodotorula* ne fermentent pas les sucres (Kurtzman *et al.* 2011). De ce fait *Rhodotorula mucilaginosa* n'a probablement pas de fonction significative dans le processus de fermentation du Suusac. Concernant *G. penicillatum* il est possible que cette levure ait un rôle dans le développement de la saveur et l'arôme dans le Suusac, à l'instar de *C. krusei* (Lore *et al.*, 2005).

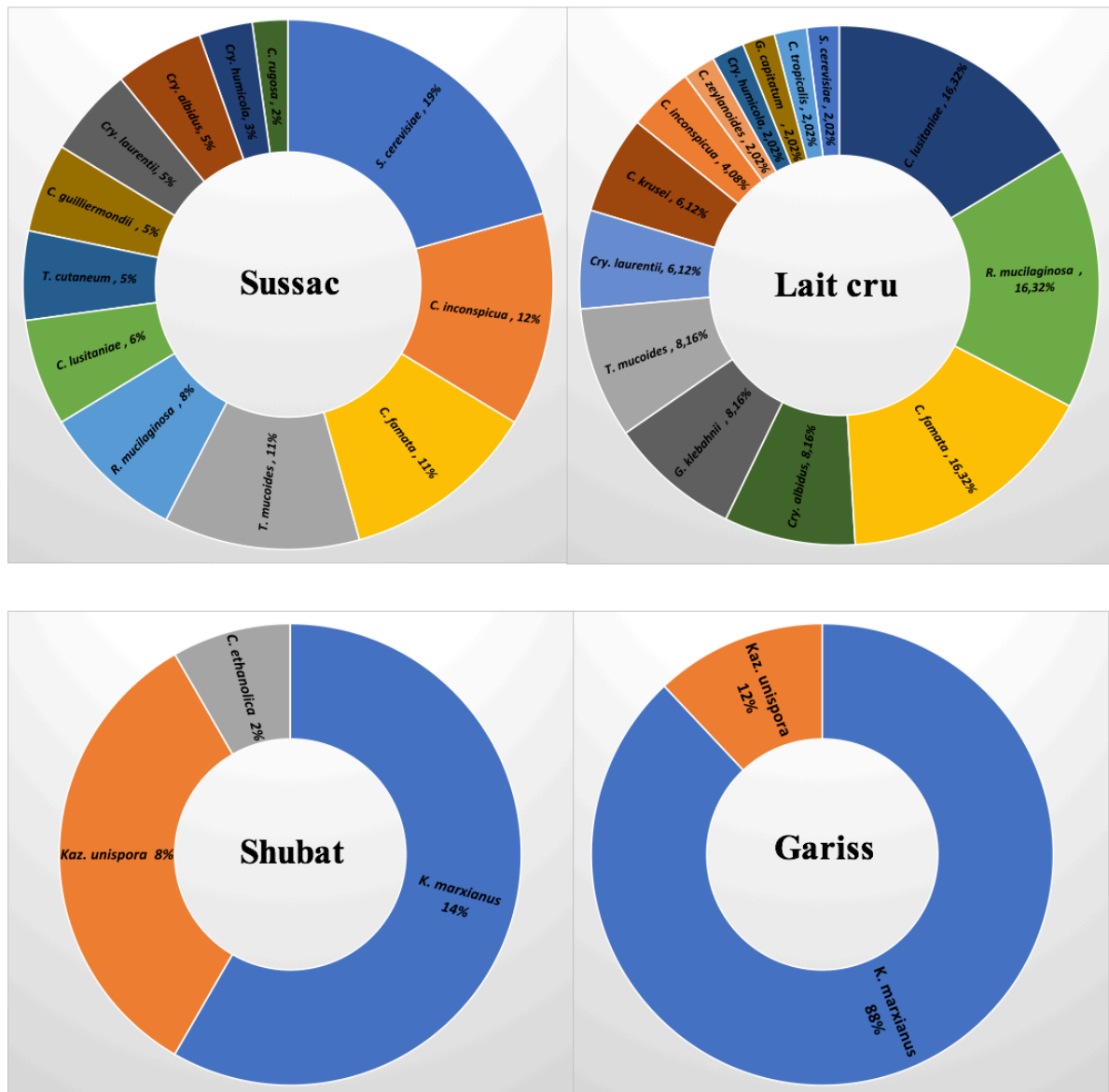


Figure 4 : schéma en rayon du soleil montrant l'occurrence et la diversité des levures dans le lait de chamelle, cru et fermenté Adapté aux (Abdelgadir et al., 2008, Lore et al., 2005, Njage et al., 2011, Rahman et al., 2009).

Chapitre 2 : Généralités sur les levures

1 La taxonomie des levures :

La taxonomie est la science de la classification, c'est-à-dire « l'attribution d'un nom à des objets à des catégories définies » (Kirk *et al.* 2001). Les champignons sont des organismes eucaryotes (contenant un noyau et des organites enveloppés par un système membranaire) et ils constituent l'un des royaumes de la vie qui contient environ 1,5 million d'espèces fongiques (Fitzpatrick et Tovar 2011). Les premiers systèmes de classification des champignons étaient basés sur des méthodes traditionnelles de systématique s'appuyant sur la morphologie des cellules végétatives et les états sexuels jusqu'aux années 1980 (Webster 1980). Ce système de classification a été amélioré grâce à la microscopie électronique à transmission, qui a apportée plusieurs détails sur l'ultra-structure des champignons tels que la détection des mitochondries, les détails de la composition de la paroi cellulaire lors de la formation ou de la germination des spores, ... etc. (Webster et Weber 2007). Les réponses physiologiques à la fermentation et les tests de croissance ont également apporté de précieuses contributions, en particulier pour caractériser les niveaux taxonomiques supérieurs. Cependant, les relations de haut niveau entre ces groupes sont moins certaines et sont mieux élucidées à l'aide de techniques moléculaires (Fitzpatrick *et al.* 2006).

Les biologistes modernes sont arrivés au concept biologique des espèces de ce royaume qui est caractérisé par quatre critères distincts. Ce sont : l'unité de reproduction, l'unité écologique, l'unité génétique et l'entité évolutive (Choudhary et Johri 2009; Boekhout et Kurtzman 1996). Cela a été encore renforcé par une autre dimension dite, le concept phylogénétique moléculaire de l'espèce, qui a révolutionné la vision de l'évolution en particulier pour les microorganismes, où les archives fossiles ne sont pas très utiles (Stansfield et Stark 2011).

Les analyses phylogénétiques initiales d'espèces fongiques avaient révélées quatre phylums distincts dans le règne fongique : les *Chytridiomycota*, les *Zygomycota*, les *Basidiomycota* et les *Ascomycota* (Fitzpatrick et Tovar 2011). Les *Ascomycota* et les *Basidiomycota* ont une relation étroite concernant leur cycle de vie qui est caractérisé par un stade dicaryotique (deux noyaux distincts et différents dans un segment d'hyphe unique) (Blackwell *et al.* 2012). Cette relation a été confirmée par de nombreuses études

phylogénétiques (Berbee et Taylor 1992; Liu *et al.* 2006). Ce qui donne naissance à un sous-domaine appelé Dikarya (Hibbett *et al.* 2007).

Dans ce contexte, l'arbre phylogénétique la plus récente est celle qui a été établie par Fitzpatrick *et al.* (2006) basé sur l'analyse génétique combinée de 42 génomes complets (Fig. 5). Cette technique utilise tous les gènes (ou au moins un grand nombre d'entre eux) pour construire une phylogénie plus robuste (Kurtzman et Robnett 2003; Rokas *et al.* 2003).

Le phylum *Ascomycota* est le plus grand phylum fongique, il représente environ 65% de toutes les espèces fongiques, principalement des levures qui ont la particularité de former des asques. Trois sous-embranchements ont été décrits dans l'*Ascomycota* ; le sous-embranchement, *Pezizomycotina*, *Taphrinomycotina* et *Saccharomycotina* dont ces espèces ne forment pas d'ascoma, ce qui donne des asques nus, et inclut des espèces importantes telles que *S. cerevisiae* (levure de bière) et *Candida albicans* (un agent pathogène humain) (Fitzpatrick 2018). Les hémiascomycètes, représentent la plus grande classe dans laquelle on retrouve le plus de genres de levures.

Le phylum des *Basidiomycota* représente environ 35% de toutes les espèces fongiques qui sont reconnaissables dans la mesure où ils produisent des carpophores complexes, notamment des champignons. La découverte que certaines levures sont des basidiomycètes a élargi la perception de la nature des levures (Fitzpatrick et Tovar 2011).

En résumé, les levures, qu'elles soient ascomycètes ou basidiomycètes, sont généralement caractérisées par le bourgeonnement ou la fission comme principal moyen de reproduction végétative et présentent des états sexuels qui ne sont pas enfermés dans les fructifications (Kurtzman *et al.* 2011).

2 La génétique des levures :

Le cycle de vie de levure implique une propagation mitotique par des formes haploïdes de deux types d'accouplement distincts nommés « **a** » et « **α** », et d'autres formes peuvent être, soit développer végétativement, par la reproduction asexuée, par le bourgeonnement et fissions transversales d'une cellule diploïde « **a/α** » conduisant à la production d'une cellule fille identique à la cellule mère, soit induisent un développement de la méiose pour générer des ascospores suite à des conditions de stress en nutriments, température, pH etc..., dans le milieu de croissance (Whiteway et Bachewich 2011). Les ascospores sont la caractéristique distinctive du phylum *d'Ascomycota*.

Un petit nombre de levures forment des basidiospores appartient au phylum de *Basidiomycota* (Whiteway et Bachewich 2011; Kutty et Philip 2008). Cet état cellulaire des levures engendre un autre type de reproduction appelé, reproduction sexuée, qui est possible par la conjugaison de deux cellules haploïdes de type « **a** » et « **α** » pour former une cellule diploïde « **a/α** » (Whiteway et Bachewich 2011). Par conséquence, l'existence de différents états dans le cycle de vie d'une levure génère une autre nomenclature pour chaque espèce, car ils ont souvent été décrits séparément et ont reçu des noms différents avant que le lien génétique qui les unisse soit établi (Webster et Weber 2007).

La forme sexuée de la levure s'appelle téléomorphe, tandis que la forme asexuée est appelée anamorphe. La levure peut avoir un nom pour chacune des deux formes anamorphiques ou téléomorphiques. Le nom de la forme téléomorphe est communément utilisé pour désigne le nom de la levure, s'il existe. Si non, la levure est désignée par le nom de la forme anamorphe (Kurtzman *et al.* 2011; Webster et Weber 2007). De nombreuses champignons asexuées (anamorphes) n'ont pas de forme sexuée (téléomorphe) (Hatoum *et al.* 2013).

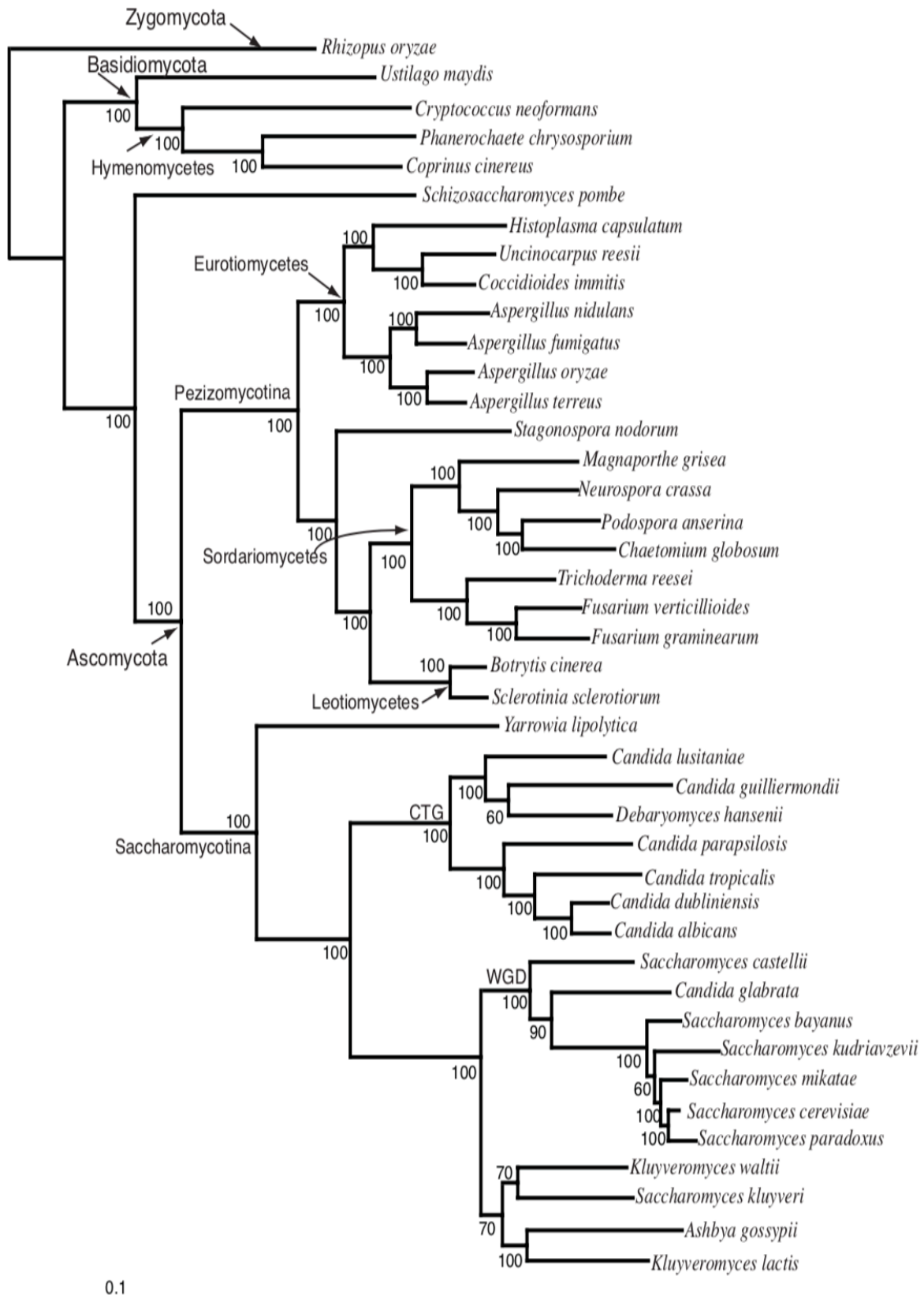


Figure 5 : Un arbre phylogénétique montrant la relation entre différentes espèces fongiques qui appartient aux trois embranchements du règne fongique, établie par (Fitzpatrick et al. 2006)

3 L'identification moléculaire des levures :

La morphologie et l'état physiologique de la cellule ont été principalement utilisés pour identifier et classifier les champignons (Usyk *et al.* 2017). Or, ces caractéristiques peuvent varier en fonction des conditions de croissance (Yamamoto *et al.* 1991). L'utilisation de ces deux approches phénotypique savaient plusieurs défauts, car elle offre un score d'identification plutôt faible, en particulier chez les levures basidiomycètes (Prillinger *et al.* 2002). De plus, la même levure peut avoir de multiples classifications taxonomiques en fonction de la différenciation morphologique qu'elle présente au long des divers stades de reproduction (c'est-à-dire anamorphe et téléomorphe) (Webster 1992). Comme dans le domaine médical, dans le secteur agro-alimentaire, cela constitue une barrière pour les chercheurs (Usyk *et al.* 2017; Espinar *et al.* 2006). Depuis ces dernières années, plusieurs techniques d'identification ont été développées pour perfectionner l'identification et la classification des levures (Vasdinyei et Deak 2003). Mais les dernières technologies de séquençage devraient avoir un impact considérable sur l'étude de la biodiversité fongique et l'écologie (Begerow *et al.* 2010).

Les méthodes moléculaires qui ciblent les régions génétiques spécifiques sont considérées les plus conformes, car elles analysent le génome indépendamment de l'état physiologique de la cellule (Usyk *et al.* 2017; Espinar *et al.* 2006). Parmi ces méthodes, les plus recommandées pour une bonne identification des levures d'intérêt alimentaire, sont celles basées sur l'interprétation de l'analyse de la séquence nucléotidique ribosomiale, utilisée depuis plus de 20 ans pour le diagnostic et la phylogénétique fongiques (Begerow *et al.* 2010; Prillinger *et al.* 1997). Selon Lutzoni *et al.* (2004), entre 1990 et 2003, 560 articles de recherche sur les champignons ont décrit des phylogénies, dont environ 84% ont été dérivés de l'ADNr. Par ailleurs, l'analyse génétique des génomes complets permet de construire une phylogénie plus robuste, comme celle de Fitzpatrick *et al.* (2006) (Fig. 5).

Chez les levures l'ADNr est composé de trois régions utilisées comme cibles moléculaires d'identification, les gènes 18S, 5.8S et 26S de l'ADNr, car elles sont conservées parmi les même espèces et varient entre les différentes espèces (Zhao *et al.* 2018; Kurtzman *et al.* 2011).

La petite sous-unité ribosomique nucléaire 18S (SSU) chez les levures est l'homologue de la sous-unité 16S chez les bactéries, mais la 18S (SSU) est couramment utilisée en phylogénétique, cependant 16S est utilisé pour le diagnostic des espèces bactériennes

(Stackebrandt et GOEBEL 1994). Néanmoins, perpétuellement la différenciation entre les espèces fongiques avec des séquences d'ADNr est limitée dans un petit habitat entre un faible nombre d'espèces fongiques (Poll *et al.* 2010).

Par ailleurs, la grande sous-unité ribosomique nucléaire 26S (LSU) est aussi un marqueur phylogénétique privilégié par de nombreux mycologues (Schoch *et al.* 2012). Vu qu'elle offre la possibilité d'une identification génotypique fiable à l'aide de la région D1 / D2 de LSU qui est disponibles chez toutes les levures ascomycètes (Kurtzman et Robnett 1998) et basidiomycètes connues dans la banque de données GenBank (Fell *et al.* 2000). De plus, elle n'a pratiquement aucun problème d'amplification, de séquençage, d'alignement ou d'édition (Schoch *et al.* 2012). Mais parfois, pour discriminer une espèce dans l'échantillonnage environnemental, il est préférable de combiner la région D1/ D2 avec la région des espacements internes transcrits (ITS1 et ITS2) du gène 5.8S, cela peut permettre simultanément une identification d'espèces avec l'ITS et l'analyse phylogénétique avec LSU (Klaubauf *et al.* 2010; Schoch *et al.* 2012). Pour chacune des régions suivantes 18S, 5.8S et 26S de l'ADNr des amorces sont optimisées pour l'amplification (Fig. 6), selon le concept de code à barres ADN (Schoch *et al.* 2012; Kurtzman et Robnett 1998; Fell *et al.* 2000; Begerow *et al.* 2010).

On admet que la région D1 / D2 de LSU ainsi que la région des espacements internes transcrit ont été adoptées pour caractériser les espèces bien avant l'emploi des codes à barres officiellement reconnu (Seifert 2009; Kurtzman et Robnett 1998), mais la conception de tels codes à barres fournit un nouveau paradigme pour la taxonomie fongique (Usyk *et al.* 2017). Le choix d'un codage à barres de l'ADN fiable comme un outil majeur d'identification des champignons dépend en grande partie du développement de bases de données de séquences de haute qualité, soigneusement préparées par les taxonomistes et les systématiciens (Begerow *et al.* 2010).

Dans ce contexte, auparavant, seule la région correspondant aux domaines D1 et D2 situés à l'extrémité 5' du gène 26S est couramment utilisée (Kurtzman et Robnett 1998; Fell *et al.* 2000). Mais actuellement, la région ITS est considérée comme avantageuse par rapport aux autres régions d'ADNr pour traiter des questions de recherche relatives à la systématique, à la phylogénie et à l'identification de souches et de spécimens au niveau de l'espèce et au-dessous, car elle est le marqueur génétique de champignons le plus fréquemment séquencé (Begerow *et al.* 2010; Schoch *et al.* 2012). Environ 172 000 séquences ITS fongiques

complètes sont déposées dans GenBank, représentant environ 15 500 espèces et 2 500 genres, issues d'environ 11 500 études scientifiques dans environ 500 revues (Schoch *et al.* 2012).

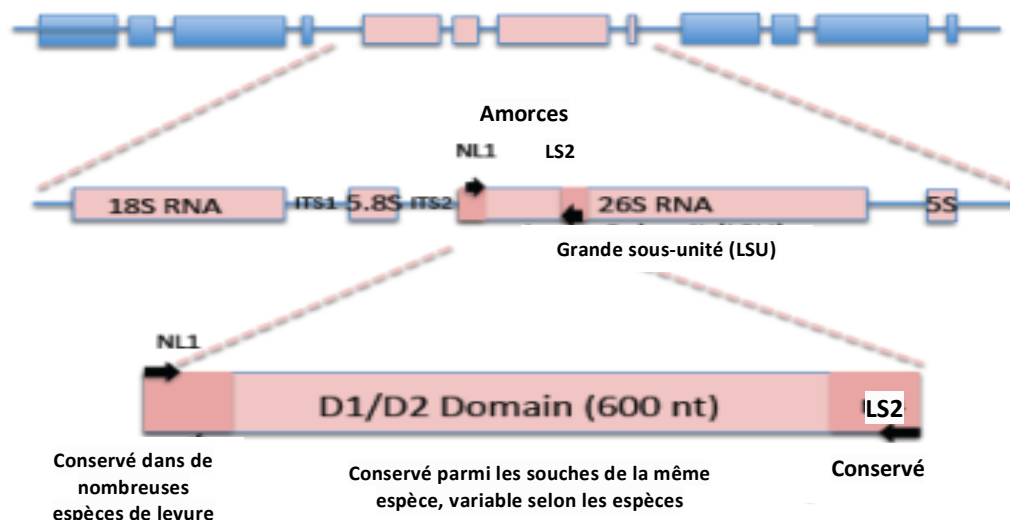


Figure 6 : schéma représentatif de l'amplification de la région D1 / D2 du gène 26S de l'ADNr et ses amorces, selon le concept de code à barres ADN (Schoch *et al.*, 2012, Kurtzman and Robnett, 1998, Fell *et al.*, 2000, Begerow *et al.*, 2010)

Ces méthodes sont basées principalement sur l'amplification et la comparaison ou l'alignement des séquences de nucléotides du gène 18S ou du gène ITS1-5.8S-ITS2 ou du domaine D1 / D2 du gène 26S de l'isolat inconnu, avec les séquences de nucléotides disponibles dans les bases de données (Fig. 6).

Ces bases de données sont souvent en ligne et gratuite et en développement permanent, contrôlées par des chercheurs connaissant parfaitement le groupe taxonomique. Les plus utilisées dans ce genre de situation sont : la base de données GenBank créée en 1993 (Kurtzman et Robnett 1998; Fell *et al.* 2000; Begerow *et al.* 2010), la base de donnée UNITE qui a été lancée en 2001 et publiée en 2005 (Kõljalg *et al.* 2005), elle est passée d'un nombre de 811 séquences, liées à 480 espèces fongiques en 2005, à près de 3000 séquences, liées à 1078 espèces fongiques, en 2009 (Abarenkov *et al.* 2010). Et la base de donnée SILVA qui contient 3 194 778 séquences de gènes de SSU et 288 717 de gènes de LSU d'ARNr, mais ces séquences proviennent des bactéries, des archées et des eucaryotes (Quast *et al.* 2012).

Cette technique de séquençages et d'alignements est un outil très puissant pour attribuer une levure inconnue à une espèce spécifique lorsque le pourcentage d'homologie de ses séquences est supérieur ou similaire à 99% (Kurtzman et Robnett 1998).

Chapitre 3 : Applications biotechnologies des levures

1 Levures comme source de production enzymatique

Les enzymes jouent depuis longtemps un rôle central dans les expériences de l'homme visant à utiliser les systèmes biologiques à diverses fins. Cela remonte au XIX^{ème} siècle lors de la découverte de la première enzyme appelée diastase capable de convertir l'amidon insoluble en sucres fermentables par *Aspergillus oryzae* lorsqu'il est cultivée sur du riz. Le brevet portant sur cette trouvaille a été déposé par le Dr Jokichi Takamine, un immigrant japonais aux États-Unis, en 1884 (Headon et Walsh 1994). Depuis lors, plusieurs autres enzymes ont été caractérisées. Cependant, l'exploitation accrue des enzymes dans une variété de processus industriels, n'a débuté qu'après une bonne compréhension de leurs cinétiques et de leurs activités (McKelvey et Murphy 2011).

De toutes les enzymes découvertes, environ la moitié sont d'origine fongique, principalement chez les membres des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Kavanagh 2011). Ils assurent la production des trois principaux groupes d'enzymes industrielles : les enzymes techniques, les enzymes alimentaires et les enzymes pour l'alimentation animale (McKelvey et Murphy 2011). Les levures jouent un rôle significatif, et participent fortement à la production d'enzymes microbiennes dans les secteurs alimentaires et connexes. Certaines d'entre elles sont considérées comme des organismes (Généralement considéré comme sûr, GRAS) puisqu'elles ne produisent quasiment pas de métabolites secondaires toxiques, et qu'elles sont utilisées depuis des siècles pour la consommation humaine. Parmi les utilisations ancestrales de ces dernières on peut retrouver la production de pain, de bière de vin et de fromage impliquant une fermentation des substrats par des enzymes et/ou des processus de la fermentation alcoolique traditionnelle (Singh et Mukhopadhyay 2012; Fleet 1990). Dans ce contexte on peut citer les enzymes les plus utilisées dans l'industrie alimentaire essentiellement dans la fabrication des produits laitiers.

1.1 Protéase

L'activité protéolytique ainsi que le catabolisme des acides aminés est indispensable à la maturation et l'affinage de divers produits laitiers et particulièrement les fromages (Tamang et

Fleet 2009). Celle-ci consiste en l'hydrolyse de la caséine à l'aide de coagulants notamment des protéases et des peptidases microbiennes (Yvon et Rijnen 2001).

Les levures dotées de cette activité sont généralement les espèces qui appartient aux genres, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Torulospora*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Galactomyces* et *Trichosporon* (Fröhlich-wyder 2003). Cependant, les espèces les plus répandues sont *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*, *Kluyveromyces lactis var. lactis*, *D. hansenii*, *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* (Fröhlich-wyder 2003; Querol et Fleet 2006; Suzzi *et al.* 2001; Ferreira et Viljoen 2003).

Le rôle de la protéolyse par ces espèces dans l'affinage des fromages consiste en l'amélioration de la saveur et de la texture de ces derniers par la production de nombreux composés aromatiques issus du catabolisme des acides aminés à chaînes carbonées ramifiées (leucine, isoleucine et valine), des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et de la méthionine. La vocation aromatique de ces composés est due à une aminotransférase qui produit l' α -cétoacide qui subit par la suite plusieurs réactions (Yvon et Rijnen 2001). De ce fait *D. hansenii* a été commercialisée assez tôt comme ferment starter dans la fabrication des fromage, en particulier dans les fromages à pâte molle et les variétés affinées à pâte molle à semi-molle comme le brie, le camembert et les fromages à pâte persillée (Roostita et Fleet 1996; Durá *et al.* 2004). Grâce à son potentiel remarquable, sa tolérance au sel et sa présence dans les saumures, elle peut dominer la flore microbienne du fromage tout au long du processus de maturation (Roostita et Fleet 1996). De même pour *Geotrichum candidum*, qui grâce à son potentiel métabolique diversifié, est largement employée comme levain d'affinage en particulier pour les fromages à pâte molle et à croûte fleurie (Boutrou et Guéguen 2005).

1.2 Lipase

Les lipases sont produites par divers microorganismes, mais seules les lipases bactériennes et fongiques ont été bien étudiées. Ce sont des sérine hydrolases qui peuvent être divisées en quatre groupes suivant leur spécificité dans les réactions hydrolytiques : lipases spécifiques au substrat, lipases spécifiques aux acides gras, lipases régio-spécifiques et stéréo-spécifiques (Karuso 2010; Singh et Mukhopadhyay 2012).

Les lipase sont polyvalentes et peuvent exercer de nombreuses réactions de bioconversion, telles que l'inter-estérification, l'estérification, l'alcoolyse, l'acidolyse et l'aminolyse (Arevalo-

Villena *et al.* 2017). Puisque la production des lipases en masse est facile, près de 1000 tonnes de lipases sont utilisées dans l'industrie des détergents pour éliminer les taches à base d'huile.

Ces propriétés confèrent aux enzymes lipolytiques une importance colossale dans le domaine biotechnologique (Mishra et Baranwal 2009). La plupart de ces lipases sont dérivées de moisissures (Molimard et Spinnler 1996; Singh et Mukhopadhyay 2012).

Les lipases issus des levures peuvent être sécrétés par les genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Leucosporidium*, *Guehomyces*, *Cystofilobasidium*, *Wickerhamomyces*, *Meyerozyma*, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida* et *Geotrichum* (Duarte *et al.* 2013; Singh et Mukhopadhyay 2012). La lipase la plus largement utilisée dans l'industrie est celle de *Candida rugosa* (Houde *et al.* 2004). Parmi les applications les plus importantes des lipases fongiques dans les industries alimentaires, on retrouve leur rôle dans l'amélioration de la saveur et de la texture des produits laitiers (lait fermenté, fromage et beurre), par le développement d'agents aromatisants qui dérivent de la dégradation de la matière grasse de ces produits laitiers en acides gras (Arevalo-Villena *et al.* 2017; Singh et Mukhopadhyay 2012). Pour cela, Les espèces de levures couramment utilisées sont *D. hansenii*, *G. candidum* et *Y. lipolytica*. Pourtant, pour en comprendre le mécanisme cela nécessite une étude approfondie, comme c'était le cas avec *G. candidum*. selon Cygler *et al.* (1993) cette levure sécrète des lipases extracellulaires de grand poids moléculaire (~ 60 kDa) et dont la structure tridimensionnelle est connue.

Ces lipases sont reconnues pour leur spécificité aux acides gras insaturés et leur participation probable à la modification des profils d'acides gras libres en faveur des acides gras insaturés lors de l'affinage du fromage, surtout les fromages de type Camembert (Baillargeon et McCarthy 1991; Molimard *et al.* 1995).

Selon (Fleet 1990), *D. hansenii* et *Y. lipolytica* ont un impact non négligeable dans l'affinage des produits laitiers, et cela grâce à leur pouvoir lipolytique. Cependant, l'activité lipolytique de *Y. lipolytica* est plus importante que celle de *D. hansenii* (Guerzoni *et al.* 1998; Van den Tempel et Jakobsen 2000). La lipolyse de *Y. lipolytica* a fait l'objet de plusieurs études qui indiquent que cette levure peut utiliser des triglycérides comme source de carbone, grâce aux différentes lipases qu'elle peut sécréter (lipases extracellulaires, liées à la membrane ou intracellulaires) dont le poids moléculaire varie de 39 à 44 kDa (Hadeball 1991). Plus tard les gènes codants pour ces enzymes ont été identifiés. On retrouve le gène *LIP2* qui code pour la lipase extracellulaire majeure (Pignède *et al.* (2000) et les gènes *LIP7* (AJ549519) et *LIP8* (AJ549520) qui codent pour les lipases liées à la membrane (Fickers *et al.* (2005) .

De plus, la lipase LIP2 est utilisée dans la thérapie enzymatique substitutive en raison de ses propriétés biochimiques uniques, puisqu'elle présente une activité maximale à des valeurs de pH faibles et n'est pas réprimée par les sels biliaires (Bénarouche *et al.* 2014).

1.3 Autres enzymes

Les levures peuvent produire d'autres enzymes hydrolytiques qui sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, telles que :

Les pectinases ; la première enzyme polygalacturonase de levure (codée par le gène *PSE3*) a été clonée à partir de *Tichosporon penicillatum* (Blanco *et al.* 1999). Mais récemment, d'autres gènes codants pour la polygalacturonase ont été identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Stephanoascus smithiae* et *Debaryomyces hansenii* (da Silva *et al.* 2005).

Les xylannases qui dégradent le xylanne sont plus répandues chez les souches de levures basidiomycètes telle que, *Cryptococcus adeliensis*, *Cryptococcus albidus*, *Filobasidium floriforme* et *Trichosporon cutaneum* SL 409, que dans levures ascomycètes (Beg *et al.* 2001; Gomes *et al.* 2000). La combinaison, des deux enzymes pectinases et xylannases avec les cellulase sécrétée par les champignons filamenteux, est très utilisée dans la clarification des moûts de vin, des jus de fruits et dans l'alimentation animale (Kavanagh 2017).

Les microorganismes, qui produisent les bêta galactosidases (lactases), jouent un rôle clé dans la fabrication des produits laitiers fermentés telle que le Kefir, le Koumiss, Laban rayeb (laban),...etc. (Tamang et Fleet 2009). Or la plupart des organismes sont dépourvus d'enzymes qui métabolisent le lactose. Parmi les exceptions, outre les bactéries lactiques et les entérobactéries, quelques levures disposent de cette capacité comme :

D. hansenii qui peut utiliser le lactose à des niveaux de NaCl atteignant 8%. Ce qui permet de réduire le risque de fermentations indésirables, en particulier en ce qui concerne les bactéries lactiques non starter (Van den Tempel et Jakobsen 2000). De même pour l'espèce *K. marxianus* CBS 6556 qui produit de la β -galactosidase en faveur du lactosérum issu de la fabrication fromagère. Ce qui participe à la diminution de la pollution de l'environnement provoqué par le rejet du lactosérum dans la nature par les industries laitières (Rech *et al.* 1999).

La levure lactée *K. lactis* vit en forte association symbiotique avec des bactéries lactiques, grâce à son double rôle dans l'affinage des produits laitiers qui consiste en la fermentation du lactose et l'assimilation du lactate (Viljoen 2006). *K. lactis* est considérée

comme l'organisme modèle de la production du β - galactosidase utilisé dans le prétraitement du lait destiné aux consommateurs qui souffrent d'intolérance au lactose pour en abaisser la teneur (Panesar *et al.* 2010). Le gène codant pour la β -galactosidase chez *K. lactis* a été identifié (*LAC4*), et a même été exprimé de façon hétérologue chez *S. cerevisiae* (Rodicio et Heinisch 2013; Domingues *et al.* 2010).

2 Probiotiques

2.1 Histoire des probiotiques

Dans les années 40, la plupart des recherches se sont concentrées sur la culture de bactéries pathogènes et le développement de thérapies antimicrobiennes « recherche des antibiotiques » (Liu *et al.* 2018). Or, après les années 1950, un nouveau terme « probiotiques », dérive de son sens grec « *PRO BIOS* » qui signifie « pour la vie », a été introduit en 1953 par l'allemand Werner Kollath pour désigner « des substances actives essentielles pour une vie saine... » (Gasbarrini *et al.* 2016).

Les tous premiers microorganismes probiotiques ont été identifiés grâce aux travaux de Metchnikoff et Tissier, même si le mot « probiotique » n'a pas été encore inventé. Le Russe Elie Metchnikoff a remarqué l'espérance de vie exceptionnelle des Bulgares pour l'époque, et après un sondage, il en conclut que leur longévité était liée à la consommation de yogourt fermenté. Par la suite un bacille a pu être cultivé à partir du yogourt, et qui était identique à un autre bacille trouvé dans leurs selles. Plus tard il fut nommé *L. bulgaricus* (Metchnikoff 1907).

A la même époque, Henry Tissier, un pédiatre français, a isolé chez un enfant un organisme en forme de « Y » qu'il a appelé *Bifidobacterium*. Il a suggéré que ces bactéries pourraient être administrées aux patients atteints de diarrhée pour les aider à restaurer leur flore intestinale, car il a observé que cette bactérie était très abondante dans les selles des nourrissons en bonne santé, contrairement aux nourrissons atteints de diarrhée, qui eux en avaient un faible nombre (Tissier 1907)

La définition du terme probiotique a été reformulée par la commission mixte (FAO / OMS) et est devenue la suivante : « tous *microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, confèrent un bienfait sanitaire à l'hôte* » (Food *et al.* 2006).

Conformément à cette définition, l'axe de recherche dédié à ce type d'organisme a connu un grand intérêt dans le but d'identifier de nouveaux agents probiotiques. Ceux-ci étant de fait un ingrédient de préparations thérapeutiques contenant des formes vivantes de microorganismes non pathogènes qui bénéficieront en fin de compte à l'organisme hôte (Martín *et al.* 2005).

Le tractus gastro-intestinal du corps humain commence à être colonisé dès la naissance par des microorganismes, jusqu'à ce qu'il contienne environ 400 espèces bactériennes représentant de 10^3 UFC/ml, dans de suc gastrique de l'estomac, à 10^{12} UFC/ml dans l'intestin et le côlon (Tannock 1999). Cette population bactérienne forme ce qu'on appelle la *microflore intestinale*. Cette microflore s'avère indispensable au bon fonctionnement du corps humaine et est fondamentale pour son maintien en équilibre (Mitsuoka 1992).

2.2 Propriétés des probiotique

Afin de sélectionner une souche probiotique, il est nécessaire d'effectuer des tests *in vitro* pour déterminer son potentiel probiotique chez l'homme (Soccol *et al.* 2010), ainsi que son innocuité, en suivant les critères recommandés et la méthodologie d'évaluation des probiotiques définis par le groupe mixte FAO / OMS (Food *et al.* 2006). Afin d'exprimer son potentiel probiotique la souche considérée doit être capable de survivre au passage du tractus gastro-intestinal, qui est un environnement extrêmement acide pH 2, à cause des sucs gastriques, et qui contient des sels biliaries. Ce passage dans l'intestin peut être renforcé par un véhicule alimentaire qui leur permet de survivre dans l'estomac et à l'exposition à la bile (Food *et al.* 2006). Afin d'assurer une bonne colonisation de l'intestin le microorganisme probiotique doit avoir la capacité d'adhérer à la muqueuse et aux cellules intestinales. Ces capacités d'adhérence semblent être liées au profil d'hydrophobicité des cellules, et aux capacités d'auto-agrégation de ces dernières (Fadda *et al.* 2017; Collins *et al.* 1998). Le test d'adhésion est donc indispensable, afin de déterminer si les cellules probiotiques peuvent réaliser une colonisation temporaire, qui par la suite, leur permettra d'exprimer leurs effets probiotiques, comme le renforcement de l'immunité et l'élimination des agents pathogènes (Haben Fesseha 2019). Ces derniers peuvent être aussi éliminés de l'intestin si la souche probiotique a un pouvoir antagoniste. Ce caractère est lié à la sécrétion de composés antimicrobiens, par exclusion compétitive par la co-agrégation avec l'agent pathogène ou par compétition nutritionnelle (Fadda *et al.* 2017; Collins *et al.* 1998).

Certainement, un microorganisme probiotique ne doit surtout pas posséder de résistance aux antibiotiques ou antifongiques, ou être hémolytique, car ces propriétés sont caractéristiques des agents pathogènes (Soccol *et al.* 2010).

Bien que la définition des probiotique émise par la FAO / OMS n'ait pas quantifié les apports nécessaires de microorganismes probiotiques, on pense généralement qu'au moins 10^9

unités formant colonies (UFC) doivent être ingérées par jour pour obtenir des résultats probants. Cet apport en probiotiques peut être assuré par différentes sources, disponibles sur le marché, soit sous forme d'aliments fermentés contenant par nature des microorganismes viables aux propriétés probiotiques, ou sous forme de compléments alimentaires vendus à des fins probiotiques sous forme lyophilisée (Buzzini et Vaughan-Martini 2006).

La consommation grandissante de probiotiques, a favorisé une évolution considérable du marché mondial des ingrédients probiotiques qui a atteint, selon Agheyisi (2008), 14,9 milliards de dollars en 2007. Celui-ci a ensuite évolué pour atteindre 15,9 milliards en 2008 et 19,6 milliards en 2013, soit un taux de croissance annuel de 4,3%.

2.3 Microorganismes probiotiques

Chaque microorganisme est différent selon son potentiel probiotique, ceci même au sein d'une seule et même espèce. Cette différence peut être attribuée aux capacités d'adhésion de la souche et à ses effets immuno-modulateurs et anti-inflammatoires spécifiques (Socol *et al.* 2010).

En ce qui concerne l'adhésion, les probiotiques colonisent trois régions différentes du tractus gastro-intestinal (TGI); les épithéliums entérocytaire, caecal et colique (Rastall 2004). L'intestin grêle étant un environnement dépourvu d'oxygène, il est aisément colonisé par les probiotiques qui sont anaérobies facultatifs tels que *Lactobacillus* et *Streptococcie* et des anaérobies stricts comme *Bacteroides* et *Bifidobacterium* (Haben Fesseha, 2019). Ces dernières sont parmi les genres les plus abondants, avec *Eubacterium*, de la flore intestinale totale de l'adulte représentant environ 25% de la microflore intestinale (Finegold *et al.* 1983).

Le régime alimentaire est un facteur important influençant la composition de la microflore intestinale en générale, notamment les bifidobactéries. Leur multiplication est stimulée par les composants glycoprotéiques de la k-caséine dans le colostrum humain et, dans une moindre mesure, le lait humain (Sgorbati *et al.* 1995). Elle est également influencée par l'âge de l'individu.

Selon Gomes et Malcata (1999), outre que le tractus intestinal, les bifidobactéries peuvent être aussi présentes dans d'autres écosystèmes comme les caries dentaires et la flore vaginale. Dix espèces identifiées de bifidobactéries sont d'origine humaines, dix-sept proviennent des tractus digestifs des animaux ou du rumen, deux des eaux usées et une du lait fermenté, ce qui

fait un total de 30 espèces qui sont incluses dans le genre *Bifidobacterium*. Les espèces les plus utilisées comme probiotique sont les suivantes : *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. essencis*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum* (Krishnakumar et Gordon 2001; Soccol *et al.* 2010).

De même, les *Lactobacillus*, sont parmi les genres de microorganismes probiotiques les plus couramment utilisés en nutrition humaine (Cook *et al.* 2012). D'après Gomes et Malcata (1999) le genre *Lactobacillus* est composé 56 espèces, les espèces plus connues en tant que probiotique sont : *L. acidophilus*, *L. bulgaricus ssp. Bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* (Hammes et Vogel 1995; Charteris *et al.* 1997; Soccol *et al.* 2010). Un grand nombre de ces espèces constituent une partie importante de la microflore indigène de l'homme et des animaux supérieurs, car elles sont présentes dans diverses niches écologiques à travers leurs voies gastro-intestinales et génitales. Leur distribution est affectée par plusieurs facteurs environnementaux, dont le pH, la disponibilité en oxygène, le niveau de substrats spécifiques, la présence de sécrétions et les interactions bactériennes. Leur statut GRAS leur donne la réputation de promoteurs de la santé, en particulier dans les voies gastro-intestinales et génito-urinaires humaines (Salminen *et al.* 1996).

Plusieurs études ont montré que l'association de ces deux probiotiques (lactobacilles et bifidobactéries) et leur incorporation dans le régime alimentaire de l'être humain entraîne une réduction significative du cholestérol sérique. Cela, grâce à leurs effets sur le métabolisme lipidique au niveau des intestins, le lieu de la synthèse du cholestérol, ce qui contribue par conséquent à augmenter la résistance des lipoprotéines de basse densité à l'oxydation et entraînant ainsi une baisse de la pression artérielle (Goel *et al.* 2006).

Depuis l'apparition du terme « probiotiques » et de la découverte de leur importance, plusieurs recherches visant à caractériser d'autres microorganismes non-*Lactobacillus* et non-*Bifidobacterium*, ont été menées. Dans ce contexte, plusieurs espèces du genre *Bacillus* ont révélé des caractères probiotiques tel que *B. lactis*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* et *B. cereus*. De plus certaines de ces espèces de *Bacillus* sont utilisées comme probiotiques depuis quelques années dans un produit italien commercialisé sous le nom d'Enterogermina® (Cutting 2011). Le pouvoir sporulant des *Bacillus* leur offre la possibilité d'atteindre l'intestin grêle puisqu'elles peuvent survivre au pH fortement acide de l'estomac (Barbosa *et al.* 2005).

Bien que les applications probiotiques des *Bacillus* soit recommandée chez l'être humain, notamment comme traitement d'appoint pour soulager la polyarthrite rhumatoïde (Mandel *et al.* 2010), ils sont bien plus utilisés en aquaculture, principalement dans la production de crevettes, comme stimulateurs de croissance et pour limiter le développement des bactéries pathogènes et leur virulence (Verschuere *et al.* 2000). D'autre part, plusieurs autres espèces comme : *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus* sont également considéré comme des probiotiques efficaces dans l'aviculture (Haben Fesseha 2019; Fox 1988).

2.3.1 Levures probiotiques

Bien que les microorganismes probiotiques les plus traditionnellement employés appartiennent au groupe hétérogène des bactéries lactiques (BL) (lactobacilles, entérocoques) ou plus largement à différents types bactériens (bifidobactéries, bacilles), ces dernières années les levures ont été également employés comme probiotiques, telle que *K. lactis* et plus fréquemment *S. cerevisiae* (Duman *et al.* 2005; Bonekamp et Oosterom 1994).

Les levures sont largement distribuées dans la nature et occupent plusieurs niches écologiques telles que la flore gastro-intestinale humaine normale (GI), les plantes, dans l'eau, dans les particules en suspension dans l'air, ainsi que dans divers produits alimentaires traditionnels fermentés et non fermentés (Hatoum *et al.* 2013).

En ce qui concerne le microbiote gastro-intestinal humaine normale, bien qu'il soit un environnement très hostile pour la majorité des microorganismes, ces derniers sont présents en concentration considérablement élevée, environ 10^{14} cellules microbiennes, dont 99% sont des bactéries. Les levures constituent une minorité de la population microbienne de ce microbiote avec <0,1%, majoritairement représentées par *Candida albicans* et parfois *Torulopsis glabrata* et *Candida tropicalis* peuvent être isolées (Giuliano *et al.* 1987).

Malgré cette très faible abondance, les levures peuvent survivre dans le tractus gastro-intestinal car elles sont dotées naturellement des propriétés nécessaires à leur adaptation à cet écosystème. Ainsi elles survivent à un large éventail de pH et sont capables de croître entre pH 8 et pH 1,5, avec un optimum situé entre pH 4,5 et 6,5, elles poussent bien à pH 7–8 et peuvent même surmonter l'acidité extrême à pH 3,0, et pour certaines espèces jusqu'à pH 1,5 (Czerucka *et al.* 2007). Ces conditions sont très proches de celles de l'estomac, ce qui permet aux levures

d'être de bons candidats probiotiques, car elles répondent à l'un des critères les plus importants des probiotiques qui est la résistance au pH gastrique (Soccol *et al.* 2010).

Autre particularité qui favorise les levures probiotiques, par rapport aux bactéries, c'est leur résistance naturelle aux antibiotiques. En effet en tant qu'eucaryote les levures sont insensibles à la plupart des antibiotiques ce qui permet leur utilisation simultanée avec une antibiothérapie, cela sans risque de transmission de cette résistance aux autres microorganismes (Czerucka *et al.* 2007). En outre, les levures permettent un rétablissement plus rapide suite aux déséquilibres gastro-intestinaux dues à l'antibiothérapie (Anand *et al.* 2018).

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardii* est la seule levure reconnue comme probiotique depuis des décennies (Moré et Swidsinski 2015). Elle a été la levure la plus étudiée dans ce contexte, et même la plus disponible sur le marché des probiotiques. Après sa découverte pour la première fois en 1923 par le scientifique français Henri Boulard, qui l'a isolé à partir de peaux de litchi (un Fruits d'Asie du Sud-Est), *Saccharomyces boulardii* a été l'objet de nombreuses recherches ayant pour but la caractérisation de ses propriétés biothérapeutiques (Sazawal *et al.* 2006). Son efficacité a même été établie dans le traitement de plusieurs maladies, par divers mécanismes (Fig. 7). Cette dynamique touche actuellement de nombreuses levures probiotiques non-*S. boulardii*, comme en témoigne le nombre croissant d'articles qui y sont dédiés et indexés sur Scopus. Ainsi en utilisant les mots-clés « probiotique » et « levure » sur ce site de référencement on obtient 21 articles indexés en 2000, 53 en 2005, 82 en 2011 et 129 en 2015. La liste des levures prometteuses, en tant que probiotiques potentiels, est continuellement mise à jour (Tab. 3). Bien que *S. boulardii* reste à l'heure actuelle la seule levure probiotique dotée d'un cadre réglementaire et commerciale, qu'elle soit utilisée seule ou en combinaison avec d'autres microorganismes probiotiques et/ou certains prébiotiques, sous forme de capsules ou de poudre lyophilisée en sachets, produits par divers compagnies fabricant des probiotiques tel que NutriCology®, OptiBac Probiotics®, Kirkman®, etc... (Anand *et al.* 2018).

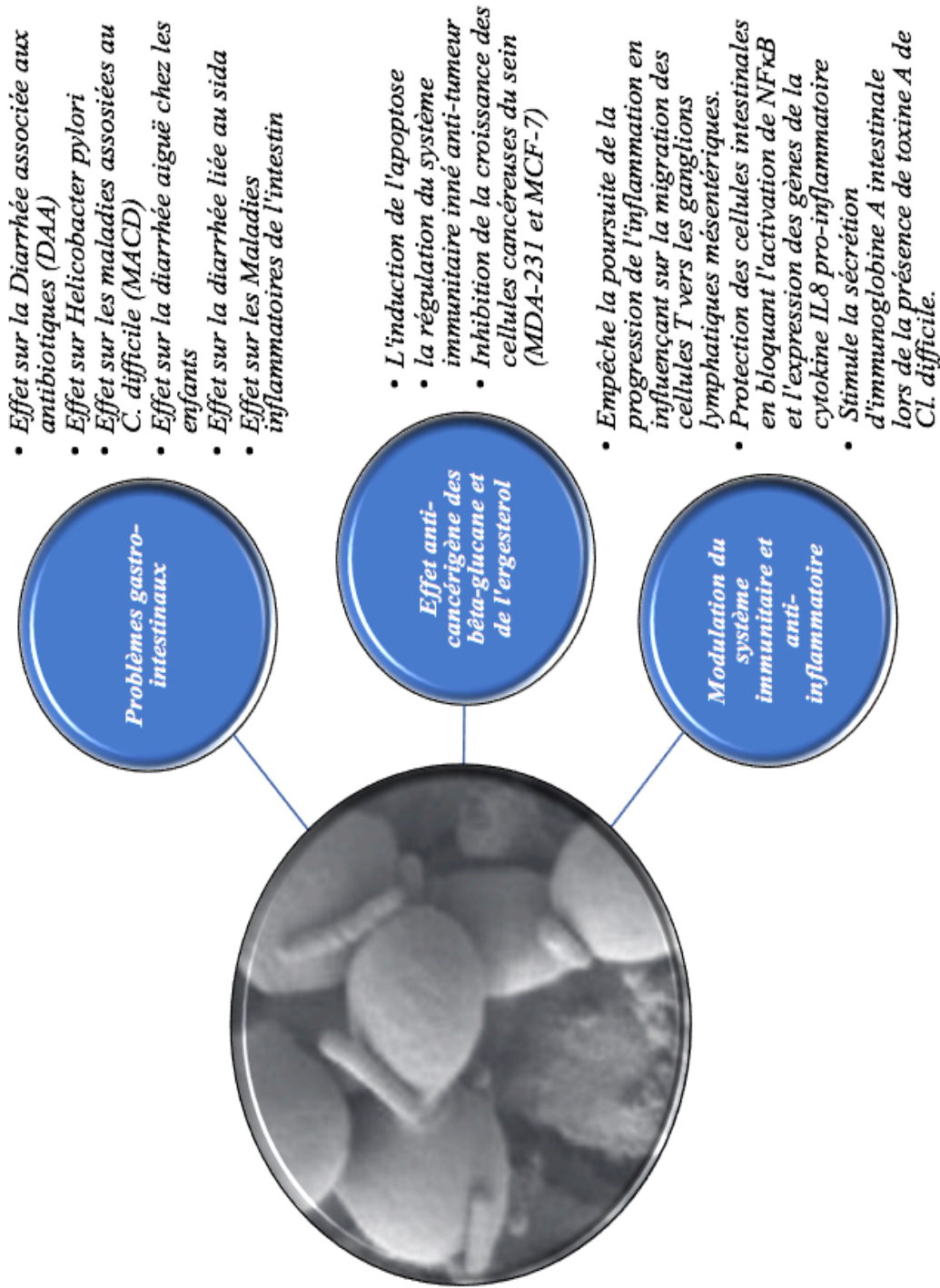


Figure 7 : Traitement de plusieurs maladies par la levure probiotique *Saccharomyces boulardii*. adapté aux (Czerucka et al., 2007, Shamekhi et al., 2020).

Tableau 4 : Les espèces de levures les plus utilisées en tant que probiotique.

Genres	Espèces	Application	Références
Saccharomyces	<i>cerevisiae</i>	Alimentation animale (Aquaculture, chamau, mammifères allaitants)	(Giger-Reverdin <i>et al.</i> 1996; Mohamed <i>et al.</i> 2009; Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> 2008)
	<i>cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Thérapeutique humaine	(Czerucka <i>et al.</i> 2007; Anand <i>et al.</i> 2018; Sazawal <i>et al.</i> 2006)
Pichia	<i>kluyveri</i>	ND	(Ogunremi <i>et al.</i> 2015)
	<i>kudriavzevii</i>	ND	(Ogunremi <i>et al.</i> 2015)
	<i>jadinii</i>	ND	(Buerth <i>et al.</i> 2016)
	<i>pastoris</i>	ND	(França <i>et al.</i> 2015)
	<i>guilliermondii</i>	ND	(Bonatsou <i>et al.</i> 2015)
Kluyveromyces	<i>lactis</i>	Alimentation humaine (produits fermenté)	(Binetti <i>et al.</i> 2013)
	<i>marxianus</i>	Alimentation humaine (produits fermenté)	(Diosma <i>et al.</i> 2014; Smith <i>et al.</i> 2015; Fadda <i>et al.</i> 2017)
	<i>lodderae</i>	ND	(Kumura <i>et al.</i> 2004)
Issatchenkia	<i>orientalis</i>	Alimentation humaine (produits fermenté)	(Ogunremi <i>et al.</i> 2015)
Candida	<i>famata</i>	ND	(Al-Seraih <i>et al.</i> 2015)
	<i>humilis</i>	ND	(Kumura <i>et al.</i> 2004)
Debaryomyces	<i>hansenii</i>	ND	(Ochangco <i>et al.</i> 2016)
Metschnikowia	<i>gruessii</i>	ND	(Smith <i>et al.</i> 2015)
Wickerhamomyces	<i>anomalus</i>	ND	(Bonatsou <i>et al.</i> 2015)
Cryptococcus	spp	ND	(El-Baz <i>et al.</i> 2018)

ND : application n'est pas encore déterminée, mais l'espèce a des propriétés probiotiques.

2.3.1.1 Effet antihypertenseur des levures

Les composés antihypertenseurs ont un intérêt primordial sur la bonne santé de l'être humaine surtout dans ces derniers temps où le régime alimentaire et le stress quotidien, ont devenus les facteurs les plus influençant sur l'augmentation du risque lié à l'hypertension artérielle, et généralement ces maladies sont traitées par médicaments chimiosynthétiques, qui provoquent souvent des effets secondaires non souhaités.

Parmi les peptides antihypertenseurs, il a été prouvé que les peptides d'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA 1), réduisent la pression artérielle (Riordan 2003)

Ces peptides peuvent être synthétique ou naturel, la capacité à prévenir l'hypertension en utilisant les peptides inhibiteurs de l'ECA 1 dérivés des protéines alimentaires, ont attiré une attention particulière dans ces dernières années, car ils peuvent représenter une alternative plus saine et plus naturelle aux médicaments inhibiteurs de l'ECA 1 (Ni *et al.* 2012).

Les aliments les plus riches en peptides ECA 1 sont souvent des produits fermentés traditionnellement ou des produits laitiers fermentés avec des souches de bactérie lactiques, seul ou en association avec les levures (Chaves-López *et al.* 2011; Chen *et al.* 2010). Il est évident que le pouvoir protéolytique de ces bactéries lactiques et/ou levures, soit la source principale de ces peptides ECA 1 (Möller *et al.* 2008).

Dans ce contexte, peu d'études ont arrivées à caractériser les espèces de levures qui sont impliquées dans ces processus, malgré son importance. Selon Chaves-López *et al.* (2012) dix-huit souches de différentes espèces de levures sur 93, impliquées dans la production du lait fermenté (Kumis), ont démontrées des valeurs d'activité inhibitrice de l'ECA 1 allant de 8,69 à 88,19%, où *C. lusitaniae* KL4A a été la souche la plus performante. De même, deux nouveaux peptides inhibiteurs de l'ECA 1 (VLSRYP et PRVC), avec des valeurs des IC₅₀ de 36,7 et 116,9 µM, respectivement, ont été isolés et identifiés à partir du lait fermenté avec la levure *K. marxianus* (Li *et al.* 2015).

Selon Roy *et al.* (2000), le résultat de la digestion du lait écrémé avec *Saccharomyces cerevisiae*, a montré une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA 1), de plus la protéase responsable de cette digestion a été identifiée, appelé protéase B.

2.3.1.2 Effet antioxydant des levures

Il existe des preuves solides que les espèces réactives des radicaux libres jouent un rôle important dans de nombreuses maladies dégénératives comme le cancer, l'athérosclérose et le diabète (Beckman et Ames 1998). Les aliments contenant des matières antioxydantes peuvent être utiles pour la prévention de ces maladies.

Les systèmes de défense humaine ne sont pas suffisamment efficaces pour prévenir totalement les dommages et, par conséquent, des compléments alimentaires contenant des antioxydants peuvent être utilisés pour aider le corps humain à réduire les dommages oxydatifs (Zommara *et al.* 1996 ; Oxman *et al.* 2000 ; Terahara *et al.* 2001 ; Kullisaar *et al.* 2003).

Cependant, Plusieurs études ont décrit l'activité antioxydante de protéines provenant de plusieurs sources animales et végétales, citant Moslehishad *et al.* (2013) qui ont démontré que la fermentation du lait de chameau avec des souches simples de BL a générée une activité antioxydante dans les fractions de lactosérum. La co-incubation des lactobacilles avec des levures a déterminé une activité antioxydante plus forte (Parrella *et al.* 2012).

Les levures peuvent contribuer différemment dans la défonce antioxydante, et cela par la sécrétion d'un composé appelé Glutathion. Ce dernier est actuellement produit à l'échelle industrielle, en utilisant des méthodes de fermentation directe utilisant *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis* avec le sucre comme matière première (Li *et al.* 2004).

Car le Glutathion « GSH » est un antioxydant important pour protéger l'ADN, les protéines et d'autres biomolécules contre les dommages oxydatifs générés, par exemple, par les espèces réactives de l'oxygène (Li *et al.* 2004).

De plus, la fraction extracellulaire des cultures de *S. cerevisiae var. de boulardii* se sont révélées riches en métabolites polyphénoliques, à savoir. L'acide vanillique, l'acide cinnamique, l'alcool phényléthylique (huile de rose), l'érythromycine, l'amphétamine et la vitamine B6, ce qui entraîne la capacité antioxydante de cette souche (Datta *et al.* 2017).

3 Mécanismes antagonistes

D'un point de vu étymologique le terme « antagonisme » désigne une action mutuellement inhibitrice ou réductrice de deux substances. Dans le monde microbien ce terme est couramment utilisé quand un microorganisme exerce cette action afin de s'adapter ou de survivre dans un environnement contenant d'autres microbes. Cette action aboutira en général par l'inhibition de la croissance ou la multiplication d'un germe d'une autre espèce, et enfin à la domination d'une seule espèce (Cormier et Francoeur 2005).

L'amensalisme est elle aussi une interaction inter-espèces où la présence de l'un ou de plusieurs microorganismes à un effet inhibiteur sur les autres microorganismes présents. A la différence de l'antagonisme, dans l'amensalisme le microorganisme inhibiteur n'en tire pas le moindre profit. L'amensalisme permet ainsi de maîtriser la croissance de microorganismes pathogènes et d'altération en utilisant des souches microbiennes, tout en préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit (Willey *et al.* 2008). C'est une méthode de conservation qui permet d'éviter l'ajout d'additifs ou de conservateurs chimiques dans les produits agro-alimentaires, cette protection est engendrée par le développement de la souche rajoutée qui, lorsque les cellules sont en nombre important, sert de barrière physique et/ou joue le rôle de compétiteur nutritionnel (Mansour 2009).

Au sein du monde microbien les levures elles aussi interagissent avec d'autres espèces en faisant intervenir plusieurs mécanismes d'antagonisme tels que :

3.1 La concurrence pour les nutriments

Tous les microorganismes ont besoin des nutriments nécessaires pour leur métabolisme cellulaire et leur croissance. Les plus importants sont les sources de carbones et les minéraux tels que l'azote (N), le phosphate (P) et le potassium (K) (Willey *et al.* 2008). Dans ce cas, la compétition consiste en la consommation rapide de ces nutriments et leur conversion en biomasse. Le taux de croissance et le dynamisme des populations dans les milieux dépendent essentiellement de leur capacité à consommer les acides aminés, et les sucres simples, ainsi que de produire des enzymes pour dégrader et consommer les molécules complexes, comme les protéines, par des protéases et des peptidases donnant par la suite des acides aminés libres et des petits peptides (Kumar 2018; Sieuwerts *et al.* 2008).

Ainsi par exemple, la levure *Saccharomyces cerevisiae* peut épuiser rapidement le glucose, le fructose ou le saccharose, ce qui empêche ainsi la croissance de microbes indésirables au cours de la fermentation des aliments et des boissons (Sharma et Saharan 2018). Un autre facteur limitant la croissance de certaines bactéries auxotrophes, est bien la disponibilité des micronutriments tels que le fer, ce qui pousse ces bactéries à produire des molécules de faible poids moléculaire, appelées « sidérophores » pour fixer le fer quand il est présent en faible teneur dans le milieu (Vyas *et al.* 2010), au sein du fromage à pâte molle (Irlinger et Mounier 2009), ou dans les rhizosphère (Sayyed et Chincholkar 2009). La compétition pour les nutriments est considérée comme le principal mode d'action contre les pathogènes fongiques post-récolte (Janisiewicz et Korsten 2002). Les levures probiotiques peuvent également agir de la sorte et consommer en premier les nutriments nécessaires à la prolifération de germes indésirables (Buzzini et Vaughan-Martini 2006).

3.2 L'inhibition par contact

Ce type d'antagonisme est un mécanisme de compétition microbien médié par les systèmes d'inhibition de la croissance dépendante du contact (CDI). Celui-ci est encore méconnu, et les informations disponibles ne concernent que les bactéries, principalement des Gram-négatif (Ruhe *et al.* 2013).

Les bactéries CDI⁺, tel que *Escherichia coli*, s'attachent avec les bactéries voisines et produisent diverses toxines nucléases qui cible l'ADN et l'ARN pour inhiber leur croissance. De plus, les bactéries CDI⁺ elles-mêmes développent une immunité spécifique grâce à des protéines qui les protègent de l'auto-inhibition. Le manque de compréhension de ce mécanisme d'inhibition semble être la cause de son non-utilisation dans les domaines biotechnologiques et la bio-préservation (Willett *et al.* 2015).

3.3 Les changements physicochimiques et l'effet de fortes concentrations d'éthanol

Outre que la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale des microorganismes peut être exercée par d'autres mécanismes, tels que les changements physicochimiques du milieu de croissance. Pour cela, le changement dans le pH, est l'un des moyens les plus utilisés par les microorganismes, résultant de l'échange d'ions couplé à la croissance ou à la production d'acide organique, de formes non dissociées causant la réduction du pH du milieu (Khajuria et Singh 2018).

Les pH très bas provoquent ainsi l'acidification du cytoplasme cellulaire, tandis que l'acide lipophile non dissocié se diffuse passivement à travers la membrane. L'acide non dissocié agit en perturbant le gradient électrochimique de protons ou en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui entraîne à son tour une perturbation des systèmes de transport du substrat (Davidson *et al.* 2005). Ce mécanisme antimicrobien est exercé par les bactéries lactiques par la sécrétion des acides organiques, qui sont les métabolites majeurs issus de la fermentation homoférmementaire tel que l'acide lactique ou hétérofermentaire tel que l'acide acétique (Mansour 2009).

L'effet inhibiteur des acides organiques est efficace sur les bactéries pathogènes telles que *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium*, dont l'inhibition par l'acide acétique est plus importante que celle obtenue avec l'acide lactique, notamment sur *L. monocytogenes* (Holzapfel *et al.* 1995; Dahl *et al.* 2000). Toutefois, les acides organiques faibles ne diminuent pas le nombre de microorganismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple, leur phase de latence (Dacosta 2000). Afin d'augmenter leur efficacité Adams et Hall (1988) recommande leur utilisation de manière synergique, car l'acide lactique baisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique.

Cet effet inhibiteur est aussi reconnu chez les levures, telle que *S. cerevisiae*, qui abaissent le pH du milieu pendant le processus de fermentation. Ce qui induit une diminution du risque de contamination par d'autres bactéries, qui elles sont généralement moins tolérantes aux pH acides (Sharma et Saharan 2018).

Outre les acides organiques, la tolérance et/ou la production de fortes concentrations d'éthanol, caractéristique des levures, et également un moyen pour exprimer un antagonisme contre les bactéries sensibles (Golubev 2006). Ceci est notamment observé durant la fabrication du vin en utilisant *S. cerevisiae*, ou lors de la production de bioéthanol par des levures fermentant le lactose, telles que *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* et quelques souches de *Candida* spp (Sharma *et al.* 2018).

3.4 La sécrétion de composés inhibiteurs

L'antagonisme microbien obtenu par la production de composés inhibiteurs est un mécanisme découvert depuis un certain nombre d'années. Ainsi, Flemming en 1928 a pu isoler la première molécule à effet antimicrobien, la « pénicilline ». Dès lors, ces molécules appelées

antibiotiques, ont été produites à grande échelle et utilisés dans la lutte contre les bactéries pathogènes et ça depuis plus de 80 ans (Aldridge *et al.* 1999).

Le développement de ce domaine de recherche a mené à la découverte de nombreux antibiotiques, d'autant plus que ce mouvement s'est accompagné de l'émergence de résistances chez les bactéries pathogènes vis-à-vis des antibiotiques les plus anciens (Czaplewski *et al.* 2016). Parmi les causes principales de la multiplication de ces mécanismes de résistance chez les bactéries, on retrouvera principalement l'utilisation abusive et déconsidérée des antibiotiques en médecine mais également dans l'alimentation des animaux destinés à la consommation humaine (Capita et Alonso-Calleja 2013).

Pour faire face à ces résistances de nouveaux axes de recherche ont été explorés pour, entre autres, trouver des alternatives capables de réduire la consommation d'antibiotiques chez l'homme et l'animal (Hoelzer *et al.* 2017). Bien que la nature des antibiotiques conventionnelles soit purement chimique, comme les β -lactams, leurs alternatives sont retrouvés plutôt parmi les peptidiques bioactifs qui présentent des propriétés antibactériennes ou antifongiques (Jin *et al.* 2009; Lee *et al.* 2012). Ces antibiotiques peptidiques peuvent être divisés en sept groupes : I, peptides linéaires ; II, peptides cycliques ; III, glycopeptides ; IV, lipoglycopeptides ; V, lipopeptides ; VI, thiazolopeptides ; et VII, thiopeptides et chromopeptides (Fig. 8).

Chaque groupe peut être divisé en sous-groupes selon leurs structures chimiques, comme par exemple dans le groupe V (lipopeptides linéaires et lipopeptides cycliques), ou selon leurs activités antibactériennes, comme dans groupe VII (anti-Gram-positif, anti-Gram-négatif et antifongiques) (Buyuksirit et Kuleasan 2014).

Au sein d'un même groupe de peptides, les mécanismes d'action ainsi que la nature de la cible cellulaire peuvent différer. C'est pour cela qu'il existe plusieurs types de métabolites antimicrobiens (Buyuksirit et Kuleasan 2014).

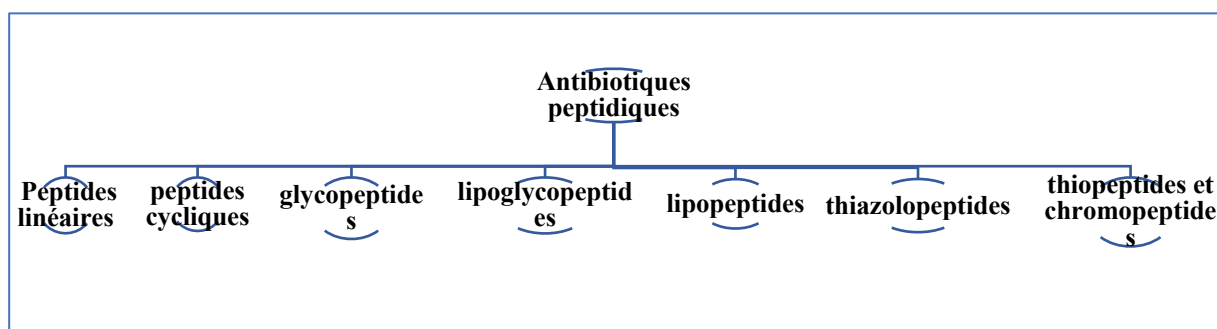


Figure 8 : Les sept groupes d'antibiotiques peptidiques et leur nature et structure.

3.4.1 Les micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

Afin de décrire si un micro-organisme a la capacité de sécréter des agents antimicrobiens. Il doit être testé contre d'autres souches de la même espèce ainsi que contre une large gamme de micro-organismes pathogènes à Gram-négatif, Gram-positif, et des champignons. Pour cela, les micro-organismes conventionnellement utilisés dans ces tests sont : *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* et *Candida albicans* (Bryskier 2005; Riley 2009).

A. *Kocuria rhizophila*

Kocuria rhizophila est une bactérie à Gram positif vivant dans le sol du genre *Kocuria*. Elle ressemble au *Micrococcus luteus*, cependant, ses seules caractéristiques phénotypiques étaient ambiguës. Elle a été désignée comme souche de contrôle de qualité dans un certain nombre d'applications ainsi que dans les tests antimicrobiens. Elle est également citée comme culture standard dans plusieurs méthodes et manuels officiels, ainsi que dans le Code of Federal Regulations (Tang et Gillevet 2003).

Selon (Tang et Gillevet 2003) sa classification est la suivante :

- Bacteria;
 - Terrabacteria
 - Actinobacteria;
 - ❖ Micrococcales;
 - Micrococcaceae;
 - *Kocuria*

3.4.2 Métabolites inhibiteurs selon la source microbienne

Divers composés bioactifs provenant de diverses sources microbiennes peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens. En effet, tous les organismes, à la fois les organismes procaryotes et eucaryotes, sont capables de produire des peptides antimicrobiens, chez les bactéries, ces composés sont appelés bactériocines (Nes 2011), alors que chez les levures, il s'agira de mycocines ou d'autres métabolites antibactériens (Hatoum *et al.* 2013).

3.4.2.1 Métabolites inhibiteurs d'origines bactérien

A. Bactériocines

Les bactériocines appartiennent à la famille des antibiotiques peptidiques qui comprend en tous plus de 400 molécules. Il s'agit d'une famille extrêmement complexe, dont les limites sont quelque peu vagues (Bryskier 2005). Toutefois le caractère discriminant est l'origine, les antibiotiques peptidiques traditionnels étant synthétisés par voie enzymatique, alors que les bactériocines sont des peptides synthétisés par voie ribosomale (Nes 2011).

L'histoire des bactériocines remonte au début des années 1920 (Nes 2011). Selon Bryskier (2005), la définition initiale des bactériocines était la suivante : les bactériocines sont des molécules qui inhibent les bactéries étroitement apparentées à la bactérie productrice. Cependant, cette définition doit être étendue à la lumière des découvertes récentes faites en la matière, pour devenir la suivante : « Les bactériocines sont des peptides bioactifs extracellulaires ou des complexes peptidiques synthétisés par les ribosomes des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, elles présentent une activité bactéricide ou bactériostatique contre une gamme étroite ou large de bactéries et exercent une activité sporostatique / sporicide contre les spores bactériennes » (Sharma *et al.* 2018; Egan *et al.* 2016).

➤ Bactériocines sécrétées par des bactéries à Gram-négatif

La première référence à l'inhibition due à une bactériocine remonte à plus de 130 ans lorsque Pasteur (1887) a signalé l'inhibition de *Bacillus anthracis* par des bactéries isolées à partir d'échantillons d'urine.

Cependant la première description et identification d'une bactériocine a été faite en 1925 par Gratia, chez la bactérie Gram-négatif *Escherichia coli* (Gratia 1925). Ces découvertes pionnières ont permis à François Jacob d'identifier la première bactériocine produite par *Escherichia coli* V, et toxique pour *E. coli* S, qui a été nommée colicine en référence à *E. coli* (Jacob *et al.* 1953). De ce fait les colicines représentent la première famille de bactériocines issues des bactéries à Gram-négatif. Ce sont des peptides de masse moléculaire élevée (30–80 kDa). La famille des microcines, elles aussi produites par les Gram-négatif, sont caractérisées par leur faible masse moléculaire (entre 1 et 10 kDa) (Rebuffat 2011).

Bien que les bactériocines des bactéries Gram-négatif proviennent principalement des entérobactéries, elles peuvent aussi provenir de plusieurs autres espèces à Gram-négatif telles que *Salmonella enterica*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Riley, 2009).

L'utilisation de ces bactéries productrices de bactériocines est limitée, car 30 à 90% des souches productrices sont souvent isolées d'hôtes humains ou d'échantillons cliniques et présente des facteurs de virulence (Riley, 2009). Toutefois ces bactériocines sont beaucoup utilisées comme système modèle pour l'étude des mécanismes d'action et des relations structure / fonction des bactériocines des Gram-négatif, ainsi que de leur organisation génétique, de leur écologie et de leur évolution (Riley, 2009).

Les mécanismes d'action des colicines et microcines est assez bien défini. Les interactions de ces bactériocines et des cellules cibles sont médiées par des récepteurs pour les deux types de peptides, cependant leur mode de destruction diffère.

Dans le cas des colicines, selon Cascales *et al.* (2007) la lyse des cellules cibles se fait par trois mécanismes principaux :

- 1- Par la formation de canaux dans la membrane interne des bactéries cibles ;
- 2- Par l'action de nucléase dans le cytoplasme ;
- 3- Par la dégradation des peptidoglycanes.

Dans le cas des microcines, les mécanismes de destruction sont très hétérogènes et incluent:

- 1- L'inhibition des enzymes bactériennes vitales, telles que l'ADN gyrase et l'ARN polymérase (Mukhopadhyay *et al.* 2004; Heddle *et al.* 2001);
- 2- Le blocage de la synthèse des protéines à l'étape de la traduction en inhibant l'aspartyl ; ARN synthétase (Metlitskaya *et al.* 2006) ;
- 3- La dégradation de la membrane interne ou de ses composants ;
- 4- La perturbation des mitochondries et la chaîne respiratoire (Niklison-Chirou *et al.* 2010).

➤ Bactériocines sécrétées par des bactéries à Gram-positif

Selon Klaenhammer (1993), 99% de toutes les bactéries peuvent produire au moins une bactériocine. Les bactériocines des bactéries Gram-positif sont aussi abondantes et encore plus diverses que celles retrouvées chez les bactéries Gram-négatif. Elles ressemblent à de nombreux peptides antimicrobiens produits par les eucaryotes ; ce sont généralement des peptides

cationiques, amphiphiles, perméabilisant pour les membranes, d'environ 2 à 6 kDa (Riley, 2009).

La plus parts des bactériocines des bactéries Gram-positif qu'on connait actuellement proviennent des bactéries lactiques (BL), y compris les genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* et certains membres du genre *Streptococcus* (Sharma *et al.*, 2018, Rea *et al.*, 2011).

Ce groupe de bactéries est très impliqué dans la préparation de divers produits fermentés, et leur rôle réside principalement dans l'augmentation de la valeur nutritionnelle et la durée de conservation du produit final (Hutkins, 2008).

Le rôle des BL dans la conservation n'était attribué qu'à la production des acides organiques tel que l'acide lactique, ...etc. Mais actuellement, des études affirment que cette conservation est due aussi à la présence des bactériocines issus des BL, qui ont révélées une bonne efficacité contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les microorganismes associés à l'altération des produits alimentaires (Riley 2009; Hutkins 2008).

Parmi les bactériocines produites à partir des BL, on retrouve les lantibiotiques (Jeevaratnam *et al.* 2005). Elles ont fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années, car beaucoup d'entre elles présentent un large spectre d'inhibition, ne sont pas toujours codés par plasmide et sont associées à des protéines immunitaires auto-protectrices (Rea *et al.*, 2011).

Étant donné que les bactériocines de bactéries à Gram-positif sont nombreuses, il est nécessaire d'établir une classification adéquate. Pour cela, différentes classifications ont été proposées depuis la découverte des bactériocines, mais actuellement la plus couramment admise est celle décrite par Klaenhammer (1993) (Fig. 10). La majorité des bactériocines utilisées en biopréservation appartiennent aux bactériocines des classes I et II (Sharma *et al.* 2018; Rea *et al.* 2011; Drider *et al.* 2006). Celles-ci peuvent être utilisées de différentes manières, mais les stratégies les plus couramment adoptées sont les suivantes : (1) Inoculation avec des cultures de BL productrices de bactériocine dans le produit (*in situ*), (2) Ajout direct de bactériocine sous forme purifiée ou semi-purifiée ou (3) Utilisation d'un produit qui a déjà été fermenté avec une souche productrice de bactériocine (Sharma *et al.* 2018).

La nisine est la première bactériocine de type lantibiotique identifiée et caractérisée en 1971 par Gross et Morell (1971). Aujourd'hui, elle est la bactériocine la plus connue, en outre, elle

englobe plusieurs variantes, mais les deux variantes nisin A (Fig. 9) et nisin Z sont les seules approuvées par américaine la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) pour une utilisation en biopréservation avec un statut GRAS (Bryskier 2005; Khajuria et Singh 2018).

Plusieurs études ont démontré que la nisine possède un large spectre d'activité contre les bactéries Gram-positif, y compris de nombreux agents pathogènes, tels que, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., et doués d'une activité anti-spoires de *Bacillus* et *Clostridium* (Schillinger *et al.* 2001; Lacroix 2010).

Cependant, la nisine n'est pas active contre les bactéries Gram-négatif, et comme les autres bactériocines, elle n'est pas non plus capable d'inhiber les levures et les moisissures (Šuškočić *et al.* 2010; Cleveland *et al.* 2001).

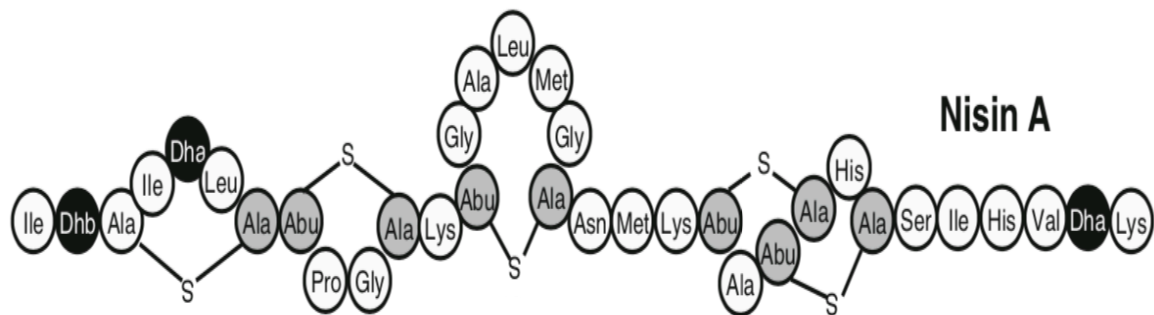


Figure 9 : la structure représentative de Nisine A. Les résidus impliqués dans les structures (b-méthyl) lanthionine sont ombrés en gris (Ala-S-Ala lanthionine ; Abu-S-Ala, b-méthyllanthionine), les autres résidus modifiés sont en noir (Dha déhydroalanine, Dhb déhydroalanine, Dhb déshydrobutyrine, D-Ala D-alanine, obu oxobutyrate) (Rea *et al.*, 2011).

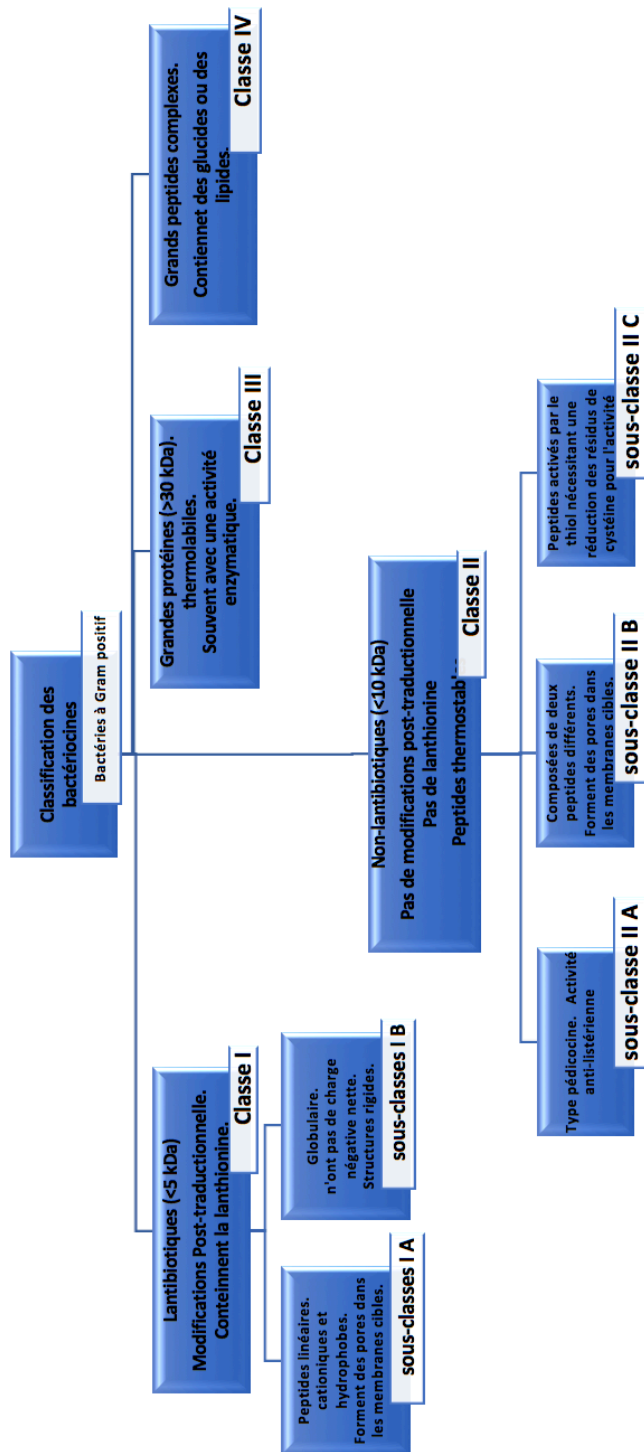


Figure 10 : Schéma de la classification original des bactériocines des Gram positifs adapté selon les données de (Klaenhammer (1993), Molimard and Spinner, (1996), Rea et al., 2011, Drider et Rebuffat, 2011).

3.4.2.2 Métabolites inhibiteurs d'origines levuriens

Dans des écosystèmes complexes, qui contiennent plusieurs types de microorganismes, les levures adoptent une variété de mécanismes antimicrobiens pour survivre et occuper une position dominante dans le milieu. Pour cela les levures sécrètent des acides organiques, des acides volatils, du peroxyde d'hydrogène de l'éthanol. Cependant, elles peuvent aussi excréter d'autres substrats à effet antifongique ou antibactérien (Viljoen 2006).

L'activité inhibitrice des levures a été découverte pour la première fois par Hayduck (1909). Plus tard, d'autres chercheurs ont rapporté l'action antagoniste des levures contre d'autres levures, impliquant la production de métabolites secondaires (Golubev 2006). Dans ce contexte, plus de détails ont été apportés en 1963, quand (Makower et Bevan 1963) ont découvert le phénomène de levure tueuse avec une souche de *Saccharomyces cerevisiae* qui a été isolée comme contaminant de brasserie.

A. Mycocines

Les souches qui sécrètent des métabolites secondaires antimicrobiennes ont été désignées « levures tueuses » et le terme « mycocines, toxine tueuse ou zymocine » a été utilisé pour décrire ces métabolites actifs (Lim et Tay 2011).

Le phénotype tueur (K⁺) et les mycocines de la levure inhibitrice *Saccharomyces cerevisiae*, ont été bien étudiés. Ces mycocines ressemblent, d'une certaine manière, aux bactériocines, du fait que leur activité est dirigée contre les organismes qui sont taxonomiquement liés à ceux qui les produisent. Cette activité se réalise par l'intermédiaire d'un récepteur et sans contact direct de cellule à cellule. Les levures tueuses sont elles-mêmes immunisées contre leur propre mycocine mais pas contre les autres mycocines (Marquina *et al.* 2002; Schmitt et Breinig 2006).

Après la découverte de la mycocinogénie chez *Saccharomyces cerevisiae*, il est rapidement devenu évident que ce phénomène n'est pas limité qu'à cette espèce, mais peut également être retrouvé parmi de nombreux autres genres de levures. Selon (Golubev 2006), plus de 100 espèces de plus de 20 genres parmi les levures ascomycètes et basidiomycètes sont productrices d'au moins une mycocine.

Jusqu'à présent, les levures qui ont une activité antimycotique remarquable ont été identifiées chez les genres : *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Sporidiobolus*, *Torulopsis*, *Williopsis* et *Zygosaccharomyces* (Bostian, Sturgeon, *et al.* 1980; Marquina *et al.* 2002; Young et Yagiu 1978).

Comme mentionné précédemment les mycocines sont des protéines, mais celles-ci peuvent subir une modification par glycosilation pour donner des glycoprotéines (Bussey *et al.* 1983). Cette dernière se composent souvent de deux ou trois sous-unités et leur masse moléculaire varie de 10 jusqu'à >110 kDa. Les plus grosses mycocines sont celles retrouvées chez *Kluyveromyces lactis*, *P. acaciae*, *P. anomala* et *P. inositovor* (Marquina *et al.* 2002).

Les gènes codants pour les mycocines des levures diffèrent selon leur localisation. C'est-à-dire, soit ils sont protégés par des plasmides d'ADN linéaires (comme chez *Kluyveromyces lactis* et *Pichia acaciae*, avec les gènes pGK11 et pPac1, respectivement) (Schaffrath et Meinhardt 2005). Soit ils sont situés sur le chromosome (comme chez *Williopsis californica* et *Pichia farinosa*, avec les gènes HMK et SMK1, respectivement) (Suzuki 2005; Theisen *et al.* 2000). Comme ils peuvent être associés à la présence de virus à ARN double brin (ARNdb) hérités du cytoplasme, comme dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bostian, Hopper, *et al.* 1980). En effet, la découverte de ce dernier encodage a marqué le début des recherches sur la virologie des levures au début des années 1970 (Bevan 1963; Herring et Bevan 1974).

Trois virus tueurs majeurs, portés par *Saccharomyces cerevisiae*, ont été découverts (ScV-M1, ScV-M2 et ScV-M28), chaque virus code pour une toxine tueuse spécifique (K1 preprotoxin, K2 preprotoxin et K28 preprotoxin, respectivement) (Dignard *et al.* 1991; Hanes *et al.* 1986; Schmitt et Tipper 1995). Le virus tueur porté par *Zygosaccharomyces bailii* (ZbV-M), code pour la Zygocin preprotoxin (Weiler *et al.* 2002). Dans chaque cas, le phénotype tueur nécessite la présence de deux virus dsRNA différents : un virus auxiliaire L-A et le virus tueur toxique (M) (Schmitt et Breinig 2006).

Les caractéristiques déterminant l'activité de ces toxines ont tendance à être similaires. La plus parts d'entre elles sont sensibles aux protéases, thermolabiles et n'agissent qu'à des pH acides (pH 2,5-4,7), à l'exception des toxines tueuses de *H. saturnus* qui sont plus stables (pH

3–11, et maintient de 75% de l'activité à 80 °C pendant 1 h) (Golubev et Shabalin 1994; Santos *et al.* 2000; Takasuka *et al.* 1995).

Les toxines tueuses des levures ont plusieurs modes d'action, selon (Marquina *et al.* 2002; Schmitt et Breinig 2006) et peuvent agir des façons suivantes :

- 1- En formant des canaux ioniques sur la cellule cible (toxines ionophoriques) (Fig. 11) ;
- 2- En augmentent la perméabilité de la membrane aux ions ;
- 3- En endommagent la membrane plasmique ;
- 4- En inhibent la synthèse du β -(1-3)-glucane ;
- 5- En induisent l'apoptose, par l'inhibition du cycle cellulaire (arrêt de G1 ou G2).

Bien que, le spectre d'action des mycocines soit étroit, celui des Zygotin de *Z. bailii* a un large spectre de destruction qui englobe les levures et les champignons filamenteux phytopathogènes et pathogènes pour l'homme, notamment *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Sporothrix schenckii* et les champignons filamenteux tels que *Fusarium oxysporum* et *Colletotrichum graminicola* (Weiler et Schmitt 2003).

L'activité fongicide des mycocines glycolipides extracellulaires des levures n'a été caractérisée que récemment, et peu d'informations sont disponibles à leur sujet. Généralement, ces glycolipides ont été considérés comme des agents émulsifiants associés à la consommation de nutriments peu solubles, ils contiennent du cellobiose (4-O- β -D-glucopyranosyl-D-glucose) lié glycosidiquement à des acides gras saturés (C16, C18) (Golubev 2006). Les plus étudiés sont les sophorolipides produite par *C. bombicola*, qui possèdent une activité contre *Candida albicans* (Cavalero et Cooper 2003).

B. Métabolites antibactériens

Plusieurs rapports ont suggéré que les toxines tueuses de levure peuvent présenter une activité contre les bactéries. Or ça n'est pas été le cas, car les tests d'antagonismes entre levures et bactérie ont montré que les mycocines sont inactives contre les bactéries (Ochigava *et al.* 2011). L'inhibition de la croissance des bactéries, quand elle est observée, étant probablement due à des produits métaboliques autres que les mycocines (Golubev 2006).

Peu d'attention a été accordée à ce type d'antagonismes levures-bactérie, et aux levures potentiellement productrices de substances inhibant les bactéries. Ceci malgré les travaux de Fernbach (1909), qui a obtenu à parti d'un extrait toxique thermolabile de levure, une amine

qui inhibait la croissance d'*Escherichia coli* et de staphylocoques. Néanmoins, depuis, chez la plupart des levures qui ont montré une action antibactérienne, celle-ci était due à la production soit de composés organiques tel que l'acétaldéhyde produit par *Saccharomyces cerevisiae* (Bachmann 1934), ou à des substances acides comme l'acide succinique chez *Candida utilis* (Florey 1949).

Un peu plus tard, Robinson *et al.* (1958) parvinrent à isoler deux substances antibiotiques, désignées I1 et I2, à partir de levures qui possédaient des propriétés inhibitrices vis à vis de *Micrococcus pyogenes* et *Escherichia coli*. Robinson *et al.* (1962) poursuivirent leurs recherches sur les deux substances antibiotiques qu'ils avaient isolées à partir de *Saccharomyces cerevisiae*, et les ont identifiés comme des polypeptides capables de survivre à la cuisson et montrant une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*.

D'autres espèces de levure comme *D. hansenii* sécrètent également des composés antimicrobiens qui inhibent la croissance de bactéries telles que *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyricum* (Fatichenti *et al.* 1983). De même *Kloeckera apiculata* et *Kluyveromyces thermotolerans*, sécrètent des substances qui inhibent la croissance des bactéries d'altération de la bière (Bilinski *et al.* 1985).

L'expression de l'activité anti-listéria des levures a beaucoup attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la biopréservation, principalement des produits laitiers. Dans ce contexte Dieuleveux *et al.* (1998) décrivent l'inhibition de *Listeria* par une souche de *Geotrichum candidum* isolée de fromage rouge français. Les deux composés anti-listéria impliqués, l'acide D-3-phényl-lactique et l'acide D-3-indol-lactique, sont stables sur une large gamme de pH et peuvent résister à une température de 120°C pendant 20 min (Dieuleveux *et al.* 1998b). Plus récemment, Hatoum *et al.* (2013) ont caractérisés les peptides hydrophobes anti-listéria extraits de cultures de quatre levures laitières identifiées comme *D. hansenii*, *P. fermentans*, *C. tropicalis*, et *W. anomala*. Les composés anti-listéria de *D. hansenii* et *W. anomalu* ont réduits la population de *L. monocytogenes* de 3 unités de log pendant les 9 premiers jours d'affinage. Les principes actifs sont des peptides thermostables qui induisent apparemment des fuites du contenu intracellulaire des cellules bactériennes provoquant leur lyse (Hatoum *et al.* 2013).

Plus récemment, Branco *et al.* (2015) ont démontré que *Saccharomyces cerevisiae* produit des peptides antimicrobiens (AMP), pendant la fermentation alcoolique, qui sont actifs contre les bactéries associées au vin comme *Oenococcus oeni*.

Les AMP sont des protéines de faible poids moléculaire (généralement de 20 à 40 acides aminés de long) qui constituent une classe diversifiée de molécules naturelles avec un large spectre d'action antimicrobien contre les bactéries, les virus et les champignons (Izadpanah et Gallo 2005; Bradshaw 2003).

Selon Branco *et al.* (2014) les AMP, produits par *S. cerevisiae*, peuvent être de nature anionique. Cependant, la plupart des AMP sont de nature cationique et agissent sur les microorganismes cibles en interagissant avec les composants anioniques des membranes cellulaires cibles (Branco *et al.* 2015).

Bien que le mode d'action exacte de la plupart des AMP reste incertain, il apparaît probable qu'ils utilisent une gamme diversifiée de mécanismes, dans lesquels la membrane elle-même est le site principal d'action, soit par translocation à travers la membrane ou par une dépolarisation ou une perméabilisation via la formation de pores, entraînant la mort des cellules (Bradshaw 2003; Matsuzaki 2009).

4 Les levures antagonistes et leurs applications :

La plupart des levures antagonistes sont obtenues à partir du microbiote épiphyte associé aux fleurs et aux fruits et présentent une gamme d'activités telles que la compétition pour les nutriments et l'espace vital, la production de substances antagonistes et la prédation (Piano *et al.* 1997).

Récemment plusieurs souches dotées de ces capacités antagonistes ont été caractérisées, et ont été souvent utilisées pour la biopréservation des aliments (Erginkaya *et al.* 2011). Le rôle des levures antagonistes a aussi connu un regain d'intérêt dans le secteur de l'agriculture, où plusieurs levures sont utilisées comme agent de lutte biologique (BCA), où elles se sont montrées efficaces dans le contrôle des phytopathogènes lorsqu'elles sont inoculées simultanément avec du bicarbonate de sodium, qui est reconnu comme GRAS par la FDA (Pimenta *et al.* 2009). Le tableau 6 donne un aperçu des espèces de levures utilisées en tant que bioconservateur des produits alimentaires et dans le biocontrôle des maladies post-récolte en agriculture.

Tableau 5 : Utilisation de levures antagonistes comme bio-conservateurs des produits alimentaires et bio-contrôleurs des maladies post-récolte des fruits et grains Adapté aux (Muccilli and Restuccia, 2015, Pimenta et al., 2009).

Espèces	Applications
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	En vinification contre les contaminants indésirables dans le vin, la bière telles que <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Dekkera anomala</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> ; en fermentation de saké; en fermentation d'olives de table contre <i>C. boidinii</i> .
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Peut agir contre <i>Penicillium digitatum</i> dans le pamplemousse en décomposition ; en fermentation d'olive contre <i>C. boidinii</i> , <i>S. exiguus</i> et <i>K. lactis</i> ; dans le yaourt et sur le fromage contre <i>Aspergillus</i> , <i>Byssoschlamys</i> et <i>Eurotium</i>
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> <i>Tetrapispora phaffii</i>	En vinification contre <i>Dekkera</i> et <i>Brettanomyces</i> ; contre <i>Hanseniaspora</i> / <i>Kloeckera</i>
<i>Filobasidium floriforme</i>	Dans la pomme contre <i>B. cinerea</i>
<i>Ustilago maydis</i>	Dans le jus de raisin contre l'espèce <i>B. bruxellensis</i>
<i>Williopsis mrakii</i>	Dans l'ensilage de maïs, dans le yaourt contre <i>Candida krusei</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; dans le Contrôle des <i>C. albicans</i>
<i>Williopsis saturnus var. saturnus</i>	Dans la biopréservation du fromage contre <i>S. cerevisiae</i> et <i>K. marxianus</i> ; dans du yaourt contre <i>C. kefyr</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Byssoschlamys</i> , <i>Eurotium</i> et <i>Penicillium</i> .
<i>Williopsis anomala</i>	Dans le stockage de blé à l'abri d'air contre <i>Penicillium roqueforti</i> et <i>Enterobacteriaceae</i> ;
<i>Candida intermedia</i> <i>Torulaspota globosa</i>	sur les pommes et les vignes contre <i>B. cinerea</i>
<i>Candida famata</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Dans le sorgho et le maïs contre <i>Colletotrichum sublineolum</i> et <i>Colletotrichum graminicola</i>
<i>Candida friedrichii</i>	Sur la papaye contre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Candida zeylanoides</i>	Sur les baies de raisin contre la contamination par <i>A. carbonarius</i> et l'ochratoxine A (OTA) dans le vin et le jus de raisin
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dans le jambon contre la croissance de <i>P. nordicum</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Cr. flavus</i> et <i>Cr. albidus</i>	Sur les baies de raisin contre <i>B. cinerea</i> ; sur les prunes et les pêches contre <i>M. laxa</i>
<i>Candida sake</i>	Pourrait potentiellement être utilisé pour lutter contre <i>Mucor</i> chez les poires.
<i>Saccharomycopsis schoenii</i>	Semble agir contre <i>B. cinerea</i> et <i>Rhizopus nigricans</i> , qui sont les principales causes de maladie post-récolte de la pomme. Utilisé dans la lutte biologique contre <i>Penicillium italicum</i> , <i>P. expansum</i> et <i>P. digitatum</i> causant la pourriture après récolte dans les oranges.
<i>Pichia guilliermondii</i>	Est efficace contre <i>Botrytis</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Alternaria</i> dans les tomates en décomposition.

5 Objectifs de la thèse

Suite à cette recherche bibliographique, nous avons remarqué qu'il y'a peu d'études qui portent sur la caractérisation des levures du lait de chamelle, moins pour le lait cru pour le lait fermenté, malgré que cette microflore puisse avoir un intérêt technologique.

Au sujet de l'intérêt technologique, les propriétés antagonistes des levures est l'objectif principale de ce projet de thèse, car d'après les données bibliographiques, on trouve que le nombre des métabolites antimicrobien issues des levures est considérablement faible par rapport à celui des métabolites antimicrobien issues des bactéries ou champignons filamenteux.

Dans ce contexte, que ce projet de thèse est base, dans lequel nous avons choisi le lait chamelle Algérien comme un écosystème type qui peut contenir des souches de levures antagonistes.

Le projet avait les objectifs scientifiques suivants :

✓ L'étude et le décryptage de la microflore levurienne du lait de chamelle.

Dans le cadre de ce projet, nous avons un utilisé le lait de chamelle, suite à ses caractéristiques distinctes par rapport aux laits des autres animaux, en particulier, le mode de vie de la chamelle et ces conditions climatiques. Trois approches seront utilisées pour apprécier cette microflore, l'approche phénotypique, génotypique et protéomique. Toute en prenant en considération la variation saisonnière et régionale de l'échantillonnage.

✓ Le criblage des levures antagonistes.

Afin de découvrir de nouvelles souches de levures antagonistes, nous chercherons donc ce potentiel sur l'ensemble des isolats vis-à-vis un large spectre de microorganismes pathogènes, dans le but d'augmenter la probabilité d'avoir un effet antagoniste. Le plus dans tout ça, est l'obtention ainsi que la caractérisation des molécules de nature protéique, afin d'envisager leur utilisation comme des bio-conservateurs et remplacent les conservateurs synthétiques utilisé dans le secteur agro-alimentaire.

✓ L'utilisation des levures antagonistes comme souches probiotique.

La recherche est dirigée particulièrement vers les levures dites non-saccharomyces. Il y'a peu d'études mettant en valeur le potentiel d'application de ce groupe de levures, contrairement à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, comme indiqué précédemment. Nous mettrons alors un criblage préliminaire des aptitudes probiotiques de ces levures,

ainsi que leur innocuité, *in vitro*, pour envisager leur incorporation dans les produits alimentaires essentiellement les produits laitiers.

Le présent travail a été réalisé en deux parties, la première au Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Département de Biologie à l'université d'Oran1 Ahmed Benbella, où nous avons effectué le traitement des échantillons ainsi que le dénombrement, la pré-identification et l'identification moléculaire des isolats de levures. Puis, la deuxième partie, elle porte sur la caractérisation du phénotype antagoniste des levures qui a été effectué dans le laboratoire ProBioGEM, de l'institut Charles Violette, Université de Lille, Lille, EA, France.

Résultats et discussion

Publication 1

Impact de la saisonnalité et des conditions
environnementales sur la diversité des levures issues du
lait de chamelle collecté en Algérie

Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria

Soufian Ider^{1,2,3}, Yanath Belguesmia², Françoise Coucheney², Mebrouk Kihal¹, Djamel Drider²

¹ Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Oran 1 - Ahmed Ben Bella, Es Senia, 31100 Oran, Algeria

² EA 7394-Institut Charles Violette, Université de Lille, 59000 Lille, EA, France

³ Present Address : Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, 47000 Ghardaïa, Algeria

Corresponding author: Djamel Drider. djamel.drider@univ-lille.fr.

Abstract

During this study, we characterized the seasonality's impact and environmental conditions on the yeast diversity from raw camel's milk collected in Algeria. The yeast counts were estimated at 3.55×10^2 CFU mL⁻¹, with a maximum of 6.3×10^2 CFU mL⁻¹. The yeasts were categorized phenotypically by API 20C AUX, MALDI-TOF and genetically by sequencing 26S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2. The rDNA sequencing approaches revealed 12 species including unusual ones such as *Trichosporon asahii*, *Pichia fermentans*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans* and *Pichia manshurica*. The most dominant species were *T. asahii* (23%), *P. fermentans* (19%) and *Rhodotorula mucilaginosa* (14%). The high occurrence and large diversity were registered in samples collected during the autumn season, in the semi-arid and arid highlands regions with 0.66×10^3 CFU mL⁻¹ and 0.51×10^3 CFU mL⁻¹, respectively. Interestingly, *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* and *C. zeylanoides* were detected during both spring and autumn.

Keywords Camel milk · Yeasts · Biodiversity · Environmental conditions · Phenotypic and genotypic characterization

Introduction

The *Camelus dromedarius* is a single-humped camel species belonging to the Camelidae family (Siboukeur 2007). In Algeria, national camel reserves were estimated, more than a decade ago to 150 thousand animals, and this trend was accompanied by an increase in the number of camel milk producers (Lhoste 2004). The geographical distribution of the camel population in Algeria encompasses the semi-arid areas, the arid areas and the full desert. Camels living in these areas are subjected to highly elevated temperatures and limited access to water sources. In spite of these harsh environmental conditions, this animal produces milk almost yearlong and in amounts considered to be greater than those from other animals living in same conditions (Park and Haenlein 2008).

Camel's milk is rich in proteins, fats, minerals and vitamins (Konuspayeva *et al.* 2009; Haddadin *et al.* 2008). Additionally, camel's milk is characterized for its high-water level, near-neutral pH and high lactose (<http://www.fao.org/docrep/003/X6528E/X6528E03.htm>). This milk content can permit the development of a rich autochthonous microbiota. Microorganisms present in such ecosystem are basically issued from teat apex, milking equipment, air, water, food, grass, soil and other environments (Coorevits *et al.* 2008; Angulo *et al.* 2009; Vacheyrou *et al.* 2011). Yeasts were found in the raw milk and their occurrence was estimated to be about 10^4 CFU mL⁻¹, mostly belonging to *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus* and *Debaryomyces hansenii* species with no pathogenic yeasts identified in camel milk (Baroiller and Schmidt 1990; Njage *et al.* 2011; Yam *et al.* 2015). Their diversity and amount in the raw milk was reported to be rearing practices dependent. In fact, yeasts with capabilities to metabolize lactose, conversely to those devoid of such metabolic activity, can easily grow and take advantage from media containing lactose as carbon source (Tourette *et al.* 2002). Proteolytic and lipolytic activities were also reported as relevant metabolic functions for some yeast species. In the fermented foods, yeasts are usually associated to lactic acid bacteria (LAB) as beneficial microorganisms (Roostita and Fleet 1996), whose interactions lead to synthesis of aromatic compounds in different cheeses (Vasdinyei and Deak 2003).

Different investigators have reported the yeast content from different milks and milk products using traditional and/or metagenomic methods (Vasdinyei and Deak 2003; Njage *et al.* 2011; Mu *et al.* 2012; Watanabe *et al.* 2008; Delavenne *et al.* 2011; Qvirist *et al.* 2016; Cardoso *et al.* 2015; Lavoie *et al.* 2012). However, camel milk's microbiota remains poorly

investigated. This study aimed at providing insightful data on the yeast diversity and contents from camel's milk collected in the arid and the semi-arid Algerian regions. Besides the aridity aspect, the seasonal impact was also considered during this study.

Materials and methods

Collection and sampling of camel's milk

The sampling procedure used here was based on the protocol described by (Njage *et al.* 2011) with minor incorporated modifications. Eleven samples of camel's milk were collected in five farms. Three of them were located in the semi-arid areas (Biskra, Djelfa and El Bayadh, cities, Algeria), and two of them were located in the arid regions (Ghardaia and Béchar cities, Algeria). The sampling was monthly performed during spring and autumn seasons. The samples were aseptically recovered from tanks and transferred to 200-mL sterile bottles.

The first sampling was conducted after the milking and under well-controlled aseptic conditions. The milk was obtained from Arbia, Targuia or Hybrid breeds. Udder was washed with diluted bleach and water to remove the remaining bleach's trace. The sample was collected in a sterile 200-mL vial, after eliminating the first three jets.

The second sampling was performed at the flock level and completed 3 h after milking in the collection tanks and then immediately gauze filtered.

The third sampling was conducted 8 h after milking in the general collection bulk tank containing camel milks collected from the surrounding farms before their pasteurization in the production unit of the camel's milk "Pâturages du M'zab" located in Ghardaïa city, Algeria. All samples were stored at 2–4 °C, for 1–2 days, during their transfer to the laboratory, where they were immediately analyzed.

Yeast enumeration and isolation

One ml of each sample was aseptically inoculated into 9 mL of sterile peptone water (0.9% NaCl, 1% peptone) to perform a serial dilution ranging from 10^{-1} to 10^{-8} . Afterwards, 0.1 mL of the inoculum was taken from the appropriate dilution and inoculated on the surface of YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose) agar plates supplemented with (1%) chloramphenicol (Sigma-Aldrich, St Louis Missouri, USA). Subsequently, two YEPG agar plates were inoculated for each dilution and incubated at 30 °C for 72 h. Colonies grown were observed and analyzed for their morphologies. Once the colonies were selected and purified, their cells were microscopically observed to ensure culture purity. Each colony isolated was

seeded in YEPG agar slants, stored at 4 °C. Long-term storage was carried out at – 20 °C in YEPG broth supplemented with 20% glycerol.

Yeast morphological study

The distinct morphologies of the yeast colonies were observed after 7 days of incubation at 30 °C on MEA (Malt Extract Agar). Division mode, ascospore formation, hypha and pseudo-hypha were included in the analysis scheme. Cell forms and aspects and their ability to form hypha, pseudo-hypha and chlamydospores were studied on rice agar medium supplemented with 1% Tween 80 (RAT) according to instructions as described by Kurtzman *et al.* (2011).

Yeast identification using API 20C AUX strips

Yeast isolates were selected based on their previous characteristics, transferred to YEPG culture medium and incubated at 30 °C for 72 h. Then, yeast suspensions were prepared in NaCl 0.85% (w/v) until a turbidity similar to tube 2 from McFarland, and transferred to API 20C AUX strips (bioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) and incubated at 30 °C for 48–72 h. Based on the recorded biochemical profiles, isolates were identified at species level using apiweb™ software (<https://apiweb.biomerieux.com>).

Molecular identification of yeasts

Genomic DNA extraction

Total DNA was extracted from yeasts as previously reported (Harju *et al.* 2004). A sample of 1.5 ml was withdrawn from a 20-h-old liquid culture grown at 30 °C and centrifuged at 4800g, 20 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 200 µl of lysis buffer [Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 100 mmol; 10 mmol Tris–HCl (pH 8.0); EDTA 1 mmol (pH 8.0)], then two repetitive heat shock cycles were performed to lyse the persistent cells. The tubes were placed in dry ice at – 70 °C until the suspensions had completely frozen. They were then incubated at 95 °C (water bath) for 1 min to thaw quickly and were immediately and vigorously vortexed for 30 s. The cell lysis was followed by a chloroform extraction and ethanol precipitation. 200 µl of chloroform was added in each tube and vortexed for 2 min and then centrifuged (20,000g, 3 min), the suspensions obtained were separated in two phases. The aqueous phase was transferred carefully into a microtube containing 400 µl ice-cold 100% ethanol and mixed by inversion. To recover the extracted DNA, the solutions were precipitated for 5 min at –20 °C and centrifuged for the same time at 20,000g. Then the supernatant was

aspirated from each tube carefully without touching the DNA precipitate, the DNA was washed with 0.5 ml of 70% ethanol and placed in an oven at 60 °C until total drying, finally, the DNA pellet was resuspended in 30 µl of 10 mmol Tris–EDTA buffer (pH 8.0). Concentration of total DNA was determined with a Nanodrop (Biowave II, UK).

DNA amplification by PCR and electrophoresis

DNAs obtained from isolates were subjected to amplification by PCR of regions from genes 26S rDNA and ITS1- 5.8-ITS2. PCR conditions, primers, and interpretation are described in Tables 1. PCR products were purified using the “Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up kit of Macherey–Nagel” (Düren, Germany), and the separated on 1.0% agarose gel labelled with 0.5% (v/v) GelRed for 2 h at 100 V. Gels were analyzed with a Gel-Doc 2000® (Bio-rad, Hercules California, USA). Then, PCR products were sequenced at Eurofins (Luxembourg, LU). BLAST search of the nucleotide sequences was conducted through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The nucleotide sequences were deposited at NCBI with the accession numbers given in Table 3.

Statistical analysis

All data obtained in this study were analyzed using the Microsoft Office Excel 2010 software, to calculate the necessary values for a statistical analysis, such as means, medians, standard deviations and percentages. The results obtained were used to determine the significant differences ($P < 0.05$) for the enumeration of yeasts between two groups according to the sampling site by the *t* test using GraphPad software online version (Motulsky 1999).

Table 1 Primers and PCR programmes used to determine yeast species genomics

PCR objective	Primer sequences	Source of primers	PCR program
Amplification 26S rDNA	NL-1 (Forward) 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3' LS-2 (Reverse) 5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'	Eurofins Germany	Initial denaturation 95°C/5 min Followed by 30 cycles including Denaturation 95°C/1 min Annealing 52 °C/45 s Elongation 72°C/1 min Final elongation 72°C/1 min
Amplification ITS1-5.8S-ITS2	ITS1 (Forward) 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' ITS4 (Reverse) 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	Eurofins Germany	Initial denaturation 95°C/5 min followed by 35 cycles Denaturation 94 °C/30 s Annealing 57 °C/30 s Elongation at 72°C/1 min Final elongation 72°C/5 min

Results and discussion

The average count of raw camel's milk fungal microbiota was estimated at 3.55×10^2 CFU. mL⁻¹. This value is close to data reported by Elhassan *et al.* (2013) for another Algerian camel's milk samples, where fungal enumeration was estimated to be 1.69×10^3 CFU.mL⁻¹. Nevertheless, differences exist with another study from Benkerroum *et al.* (2003), who estimated the Moroccan camel's milk housed to 3.8×10^4 CFU.mL⁻¹. On the other hand, the Kenyan camel's milk fungal enumeration was estimated at 10^5 CFU mL⁻¹ (Njage *et al.* 2011). The diversity of this microbiota might be dependent upon several factors including the environmental conditions, breeding and milking as well as the transport and storage of camel milk.

During our investigations, yeasts appeared to dominate the camel's milk fungal microbiota. Still in relation to yeast prevalence, we detected differences in the occurrence of yeasts during the storage of the camel milk for the 11 samples examined. In fact, after the milking process, we detected only $0.38 \pm 0.06 \times 10^2$ CFU.mL⁻¹ (Table, 2), which represents a very low count level. This concentration delineates a low contamination index explained by different factors including the cleanliness and hygiene rules applied during the milking period, and the semi-extensive farming type used by the breeders.

Contamination of camel's milk by pathogenic microbes mainly yeasts causing mastitis, appeared in our study as very improbable. The camel's milk, conversely to the cow's milk, contains less fungi (Akdouche *et al.* 2014), and different authors pointed out the clear implication of yeasts in the development of fungal bovine mastitis (Zaragoza *et al.* 2011; Ksouri *et al.* 2015). Nevertheless, cases of camel's mastitis caused by fungi represented so far only 4% and were mainly caused by *C. albicans* as the unique causative agent (El- Jakee 1998; Pal 2015).

Remarkably, an important increase in the yeast load was observed at the second (3 h) and third (8 h) points of milking process. These enumerations were estimated to $3.98 \pm 0.02 \times 10^2$ CFU mL⁻¹ and $6.3 \pm 0.01 \times 10^2$ CFU mL⁻¹, respectively. These data are in good agreement with those previously reported by Njage *et al.* (2011).

These increases can be correlated with the seasonal effect, the breeding conditions, the feeding regimes, the physiological state of camels and the pooling conditions of collected raw camel's milk in tanks. We expect that all these conditions can thus impact on the yeast diversity in the camel's milk. Nonetheless, the transport conditions, and storage temperature can influence the initial yeast content with possible development of the yeasts and contaminations

from the devices (Callon *et al.* 2007). Most of species isolated have been identified during these two stages and could result from a secondary contamination during milk collection in bulk tanks. However, after milking, we recorded a dominance of *T. asahii*, *R. mucilaginosa* and *P. fermentans*.

In the literature, studies dedicated to yeasts diversity in the raw camel's milk are scarce. In the best of our knowledge, this is the report underpinning the yeast microbiota in the Algerian raw camel's milk based on the 75 isolates obtained from the different samples collected in different regions (arid or semi-arid) and seasonally dependent. These yeasts' isolates were discriminated based on their macroscopic and microscopic morphologies. Consequently, of evident similarities risen from these criteria, only 51 isolates we considered for the rest of this study. The API 20C AUX identification was performed for initial phenotypic characterization. Their identification was completed by two robust methods, which are the sequencing of their 26S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions (Ceugniez *et al.* 2015). The data from the 26S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region sequences were compared to those available on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST ; MARS 2018). This comparison allowed to establish a phylogenetic comparison of these yeasts' strains. As reported in Table 3, a contingent based on 7 genera with 12 species was constructed for the Algerian yeast strains from camels' milk.

API 20C AUX allowed identification of species belonging *Candida* genus, among which *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. humicola*, *C. zeylanoides* and *C. inconspicua*, which were subsequently identified later using 26S rDNA genes sequencing as *C. zeylanoides*, *M. farinosa*, *C. tartarivorans*, *Pichia manshurica* and *P. galeiformis*, respectively. ITS1- 5.8S-ITS2 rDNA region sequencing led to similar identification, except for the species *P. galeiformis* which was identified as *P. manshurica*, and these species are considered as very similar (Rodrigues *et al.* 1996). (Table 3).

The molecular identification revealed the telomorphic forms of *P. fermentans*, *K. marxianus* and *Cl. lusitaniae* corresponding to *C. lambica*, *C. kefir* and *C. lusitania*, respectively. Moreover *T. asahii*, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* were identified by both methods validating the accuracy of the API 20AUX strips (bioMérieux® SA, Marcy-l'Etoile, France).

Three independent methods allowed establishing yeasts profile in the raw camel's milk collected in different areas in Algeria as the yeast diversity from this non-explored ecosystem. The most dominant species were *T. asahii* (23%), *P. fermentans* (19%) and *R. mucilaginosa* (14%). Some of these species might be of biotechnological interest as *T. asahii* like

bioconversion of isoeugenol to vanillin, lipolysis, peptidase and various enzymatic activities (Ashengroph and Amini 2017; Singh and Gupta 2016; Valle *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2016).

In the best of our knowledge, this is the first report revealing the presence of *T. asahii* species in the raw camel’s milk. This species can be isolated from different sources including soil, water and skins from humans and or other animals (Kurtzman *et al.* 2011). Interestingly, the presence of this species is reportedly found at a very low prevalence 0.2%, in the cow’s milk in Belgium (Lagneau *et al.* 1996). Bockelmann *et al.* (2008), considered this species as a contaminant commonly found in cheese production process. Suzzi *et al.* (2003) highlighted the strong proteolytic and lipolytic activities of this species and its influence on the maturation and characterization of the taste of some cheeses. On the other hand, *T. asahii* appeared to be naturally present in cheeses and other fermented products (Suzzi *et al.* 2003; Vasdinyei and Deak 2003; Jespersen *et al.* 2005; Schwan *et al.* 2007).

In this study, *P. fermentans* represented the second most important species with an occurrence of 19%. This is the first report mentioning the presence of this species in the raw camel’s milk. However, *P. fermentans*, which anamorphic form is *C. lambica*, was relatively common in the raw cow’s milk (Lavoie *et al.* 2012; Delavenne *et al.* 2011; Chen *et al.* 2010b). This species (*P. fermentans*) was found in camembert produced from the cow’s milk (De Freitas *et al.* 2008), and other milk products (Cosentino *et al.* 2001). Different studies involving this species underpinned its role in the flavor formation from dairy products such as Koumiss (Mu *et al.* 2012). These flavors are attributed to esters and flavors alcohol formations (De Freitas *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012).

Table 2: Variation in yeast concentration according to the sampling site

	Total yeasts count (x 10 ² cfu/ml)				
	First point ^a	P- value	Second point ^b	P- value	Third point ^c
	No. of samples 5		No. of samples 3		No. of samples 3
Mean	0.38	<i>P</i> <0.0001	3.98	<i>P</i> <0.0001	6.3
Standard of deviation	± 0.06		± 0.02		± 0.01
Minimum	0		1.99		3.31
Maximum	3.16		12.02		10

^a Sampling right after milking

^b Sampling after grouping the individual milk of the same flock

^c Sampling right before the pasteurization at the of the factory

Table 3: Yeast species identified phenotypically with API 20C AUX relative to 26S rDNA and ITS1-5.8s-ITS2 rDNA sequencing

Strain's code	Total	API 20C AUX (% identity)	26s rDNA (% identity) / Accession number	ITS1-5.8s-ITS2 (% identity) / Accession number
LVS01	12	<i>Trichosporon asahii</i> (100%)	<i>Trichosporon asahii</i> (100%)/(MG707737.1)	<i>Trichosporon asahii</i> (100%)/(KP162247.1)
LVS02	7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (60.6%)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99%)/(MG707723.1)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (100%)/(KR912272.1)
LVS03	10	<i>Candida lambica</i> (99.8%)	<i>Pichia fermentans</i> (99%)/(JN417648.1)	<i>Pichia fermentans</i> (100%)/(DQ842266.1)
LVS04	4	<i>Candida famata</i> (100%)	<i>Candida zeylanoides</i> (99%)/(KY512456.1)	<i>Candida zeylanoides</i> (99%)/(HF545668.1)
LVS05	4	<i>Candida lipolytica</i> (38.3%)	<i>Millerozyma farinosa</i> (99%)/(KY108569.1)	<i>Millerozyma farinosa</i> (99%)/(KY104280.1)
LVS06	3	<i>Candida parapsilosis</i> (100%)	<i>Candida parapsilosis</i> (99%)/(KF214404.1)	<i>Candida parapsilosis</i> (100%)/(KP675667.1)
LVS07	3	<i>Candida inopiscua</i> (99.7%)	<i>Pichia galeiformis</i> (100%)/(KM234447.1)	<i>Pichia manshurica</i> (96%)/(KY104600.1)
LVS08	2	<i>Candida humicola</i> (99.3%)	<i>Candida tartarivorans</i> (100%)/(HM461710.1)	<i>Candida tartarivorans</i> (99%)/(FN428939.1)
LVS09	2	<i>Candida kefyr</i> (49%)	<i>Klyuveromyces marxianus</i> (100%)/(KJ491106.1)	<i>Klyuveromyces marxianus</i> (100%)/(KF851354.1)
LVS10	1	<i>Candida zeylanoides</i> (99.4%)	<i>Pichia manshurica</i> (100%)/(MG707684.1)	<i>Pichia manshurica</i> (97%)/(KY104600.1)
LVS11	2	<i>Candida lusitania</i> (100%)	<i>Clavispora lusitaniae</i> (98%)/(MG871742.1)	ND
LVS12	1	<i>Candida maris</i> (99.5%)	ND	ND

Notably, *R. mucilaginosa* or *R. rubra* characterized here belongs to the Basidiomycetous yeasts (Barnett *et al.* 1990). This is the third abundant species with a frequency of 14% recovered in this study. This occurrence is in good agreement with that reported by Njage *et al.* (2011) and Lavoie *et al.* (2012). This species was commonly reported as pathogenic and contaminant in raw milk (Delavenne *et al.* 2011). It is present in the production environments (air, soil, wall, equipment and water), and for this reason, it may end up in different products as cheeses, butters or yogurt (Lopandic *et al.* 2006; Lavoie *et al.* 2012).

The 38% remaining isolates encompassed 9 species and most of them were isolated for the first time from the raw of camel's milk. These species included *M. farinosa* (8%), *P. galeiformis* (6%), *C. tartarivorans* (4%), and *P. manshurica* (2%).

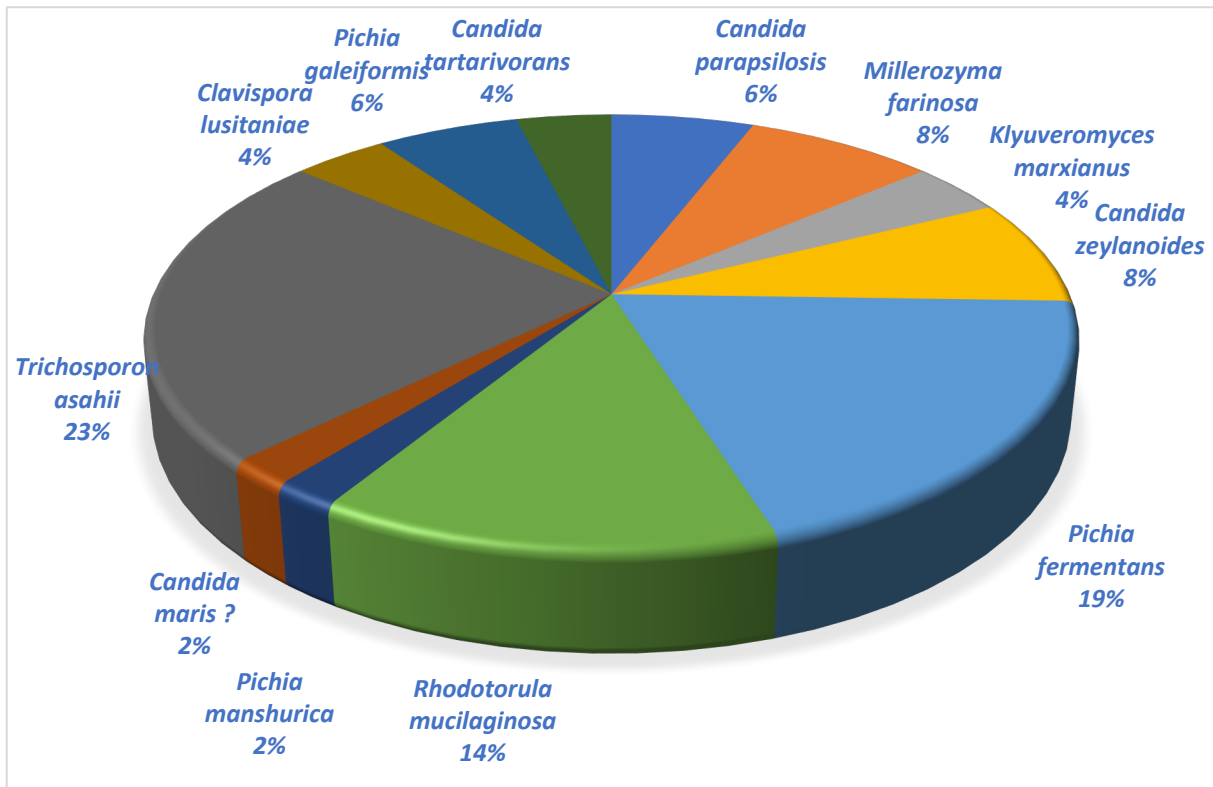


Fig. 1 Yeast diversity and occurrence from the Algerian camel's milk. The data are presented as a percentage of the total yeast population as determined from phenotypic and genomics data

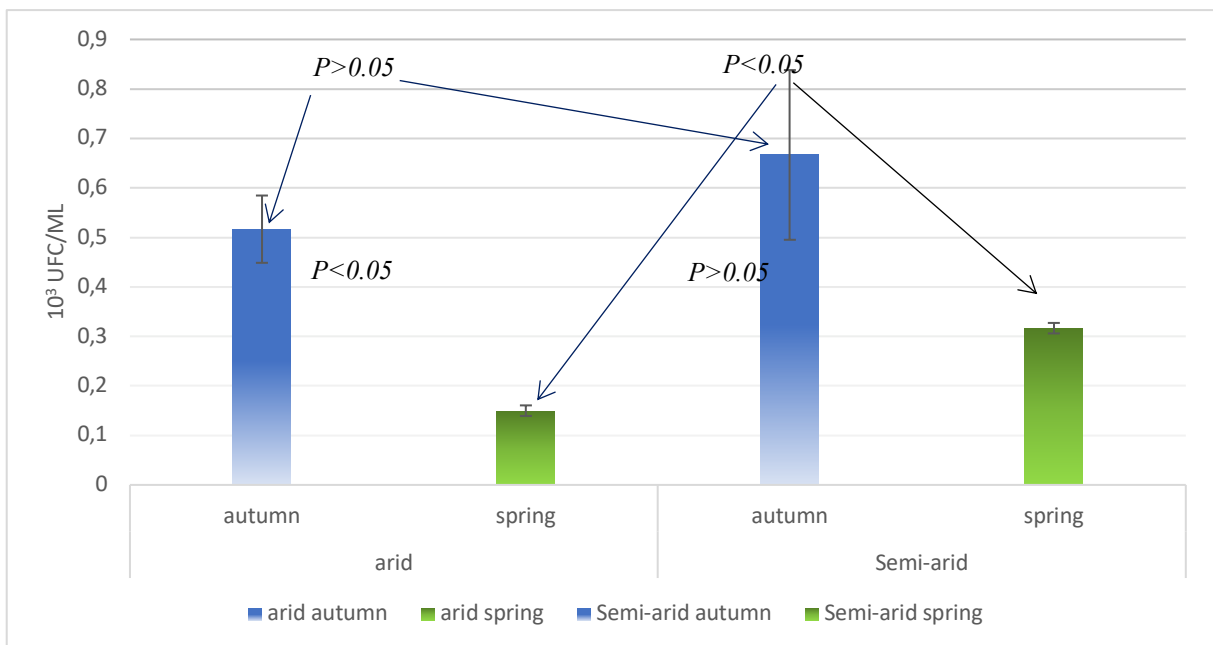


Fig. 2. Quantitative analysis of the yeast population of she-camel milk according to regions and the seasons. Data are presented as colony forming units (CFU) per ml during two periods of the year as reported in the methods

These species were identified molecularly but not by the API 20C AUX strips, which argue on their limited availability in the API 20C AUX databases.

Some widely cited species such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, and *Geotrichum candidum* were not found during our investigation. Interestingly, *C. zeylanoides*, reported as the dominant yeast species for the goat milk microbiota (Fadda *et al.* 2010) was encountered here but in small amounts, only 8%.

Several factors can influence the profile of native microbes in the raw milk, and seasonality can be one of them (O'Sullivan and Cotter 2017; Callon *et al.* 2007). Here, we noted that the yeast content has reached its upmost peak, in the semi-arid highlands region, during the autumn season. Indeed, we noted that in the same region, during spring period, a decrease in the number of yeasts although the P value was not significant ($P > 0.05$).

In the arid Saharan region, the difference in yeast load between the two seasons was significant ($P < 0.05$), and the camel's milk contained more yeasts content during the autumn (Figs. 1, 2). Data risen from this study and connected to seasonal impact are in good agreement with those reported by Callon *et al.* (2007) on the goat's milk. In another study, no significant difference was observed in terms yeast enumerations in Serro Minas, a traditional Brazilian cheese from raw bovine milk, studied in different seasons (Cardoso *et al.* 2015).

Here, the identification performed on yeasts isolated in October and March, allowed us to address the yeasts content, and shed light on the seasonality impact on this diversity.

A proportional relationship between yeast concentration and their diversity is noted as indicated on Figs. 2 and 3. In fact, during autumn season, the concentration of yeasts was important, and 11 species were identified, conversely to spring season where only 6 species were encountered. Among the 12 different species identified during spring and autumn, *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* and *C. zeylanoides* were found in both seasons.

The presence of these yeast can be related to the environmental factors and camel rearing, which are the main sources of the microbial population of camel's raw milk (Vacheyrou *et al.* 2011). Otherwise, the presence of other species such as *M. farinosa*, *P. galeiformis*, *C. tartarivorans* and *P. manshurica* seems to be influenced by the climate.

Taking these results together, we provide for the first time the camel's milk yeasts microbial content and enumeration delineating differences with other kinds of milks. Interestingly, the seasonality in the Algerian arid and semi-arid regions appeared to influence the yeast population in the collected camel's milk. The screening of the yeast population and the characterization of the fungal microbiota from the Algerian camel milk are important to

understand and decrypt this aborigine microbiota, which functionality deserves to be performed.

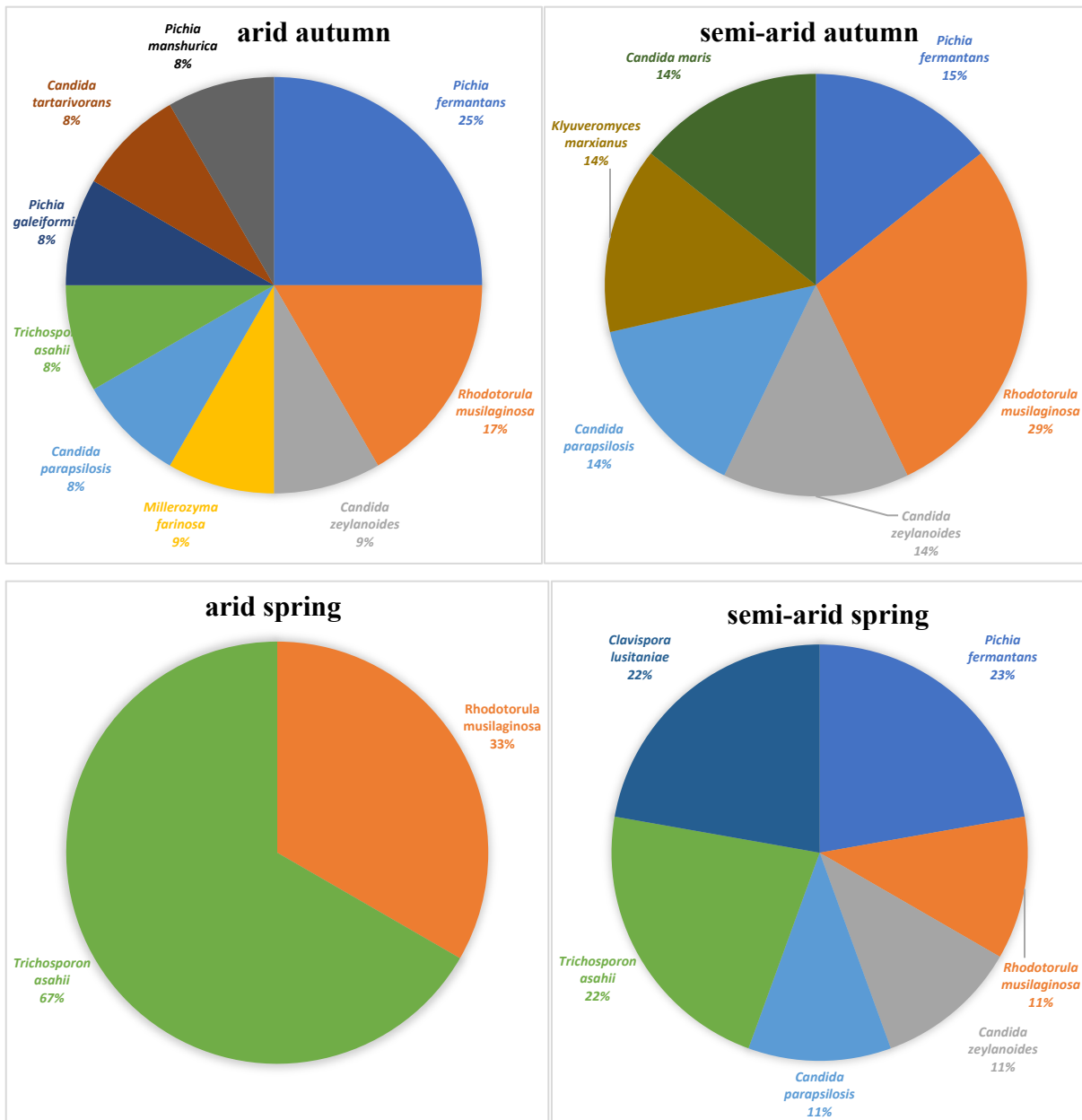


Fig. 3 Qualitative analysis of the yeast population of she-camel milk according to regions and the seasons. Data are presented as a percentage of the total yeast population numbers

Acknowledgements Sofian Ider received a short-term PhD Grant from the Algerian Government. The authors are indebted to la region des Hauts-de-France through CPER/FEDER Alibiotech Grant [2016–2020], allowing experimental work at Lille University as well as support postdoctoral position of Dr. Yanath Belguesmia. The authors are indebted to Dr. Bruce Seal (Oregon State University Cascades) for critical reading of the manuscript

References

- Abdelgadir W, Nielsen DS, Hamad S, Jakobsen M (2008) A traditional sudanese fermented camel's milk product, gariss, as a habitat of *Streptococcus Infantarius* subsp. *Infantarius*. *Int J Food Microbiol* 127:215–219
- Akdouche L, Aissi M, Zenia S, Saadi A (2014) Importance of yeasts in the mammary infection of the cattle in the region of Sidi M'hamed Ben Ali, Wilaya Of Relizane, Algeria. *J Vet Sci Tech- nol* 5:2. <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000172>
- Angulo FJ, Lejeune JT, Rajala-Schultz PJ (2009) Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin Infect Dis* 48:93–100
- Ashengroph M, Amini J (2017) Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. *Biotech* 7:358
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1983) *Yeasts: characteristics and identification*. University Press, Cambridge
- Baroiller C, Schmidt JL (1990) Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Lait* 70:67–84
- Bockelmann W, Heller M, Heller KJ (2008) Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (Ardra). *Int Dairy J* 18:1066–1071
- Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, Montel MC (2007) Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* 30:547–560
- Cardoso VM, Borelli BM, Lara CA, Soares MA, Pataro C, Bodevan EC, Rosa CA (2015) The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian Cheese. *Food Res Int* 69:331–340
- Ceugniet A, Drider D, Jacques P, Coucheney F (2015) Yeast diversity in a traditional French Cheese “Tomme D'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 52:177–184
- Chen LS, Ma Y, Maubois JL, He SH, Chen LJ, Li HM (2010a) Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Sci Tech* 90:537–548
- Chen LS, Ma Y, Maubois JL, Chen LJ, Liu QH, Guo JP (2010b) Identification Of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *Int J Dairy Tech* 63:47–54
- Chen LS, Cui J, Ding QB, Ma Y, Chen LJ, Dong JY, Jiang TM, Maubois JL (2012) The effect of yeast species from raw milk in china on proteolysis and aroma compound formation in Camembert-type cheese. *Food Bioproc Tech* 5:2548–2556
- Coorevits A, De Jonghe V, Vandroemme J, Reekmans R, Heyrman J, Messens W, De Vos P, Heyndrickx M (2008) comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Syst Appl Microbiol* 31:126–140
- Cosentino S, Fadda ME, Deplano M, Mulargia A, Palmas F (2001) Yeasts Associated with Sardinian Ewe's dairy products. *Int J Food Microbiol* 69:53–58

- De Freitas I, Pinon N, Berdagué JL, Tournayre P, Lortal S, Thierry A (2008) *Kluyveromyces lactis* but not *Pichia fermentans* used as adjunct culture modifies the olfactory profiles of cantalet cheese. *J Dairy Sci* 91:531–543
- De Freitas I, Pinon N, Maubois JL, Lortal S, Thierry A (2009) The addition of a cocktail of yeast species to cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int J Food Microbiol* 129:37–42
- Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany JL, Barbier G, Le Blay G (2011) Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol* 151 : 247–251
- Elhassan B, Ayat M, Dahan T, Smahi K (2013) Level of control of the hygienic quality of camel milk (*Camelus dromedarius*) in South West Algeria and its impact on security. *Peak J Food Sci Tech* 1:53–60
- El-Jakee J (1998) Microbiological Studies on mammary glands of one humped she-camels in Egypt. *J Camel Pract Res* 5:243–246
- Fadda ME, Viale S, Deplano M, Pisano MB, Cosentino S (2010) Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sar- dinia. *Int J Food Microbiol* 136:376–380
- Haddadin MS, Gammoh SI, Robinson RK (2008) Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *J Dairy Res* 75:8–12
- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: bust N'grab. *BMC Biotechnol* 4:8
- Jespersen L, Nielsen DS, Hønholt S, Jakobsen M (2005) Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African Cocoa Beans. *FEMS Yeast Res* 5:441–453
- Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G (2009) The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *J Food Composition Anal* 22:95–101
- Ksouri S, Djebir S, Hadeff Y, Benakhla A (2015) Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two North-Eastern Regions of Algeria. *Mycopathologia* 179:327–331
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, NY
- Lagneau P, Lebtahi K, Swinne D (1996) Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 135:99–102
- Lavoie K, Touchette M, St-Gelais D, Labrie S (2012) Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Tech* 92:455–468
- Lhoste F (2004) *Lait De Chamelle Pour L'afrique. Fao Brochure*
- Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F, Prillinger H (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol* 23:341–350
- Lore TA, Mbugua SK, Wangoh J (2005) Enumeration and identification of microflora in Suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lwt-Food Sci Tech* 38:125–130
- Motulsky H (1999) *Analyzing data with graphpad prism*, Graphpad Software Incorporated
- Mu Z, Yang X, Yuan H (2012) Detection and identification of wild yeast in koumiss. *Food Microbiol* 31:301–308
- Njage P, Dolci S, Jans C, Wangoh J, Lacroix C, Meile L (2011) Characterization of yeasts associated with camel milk using phenotypic and molecular identification techniques. *Res J Microbiol* 6:678
- O'Sullivan O, Cotter PD (2017) Microbiota of raw milk and raw milk cheeses. In: *Cheese (Fourth Edition)*. Elsevier, NY
- Pal M (2015) First record of camel mastitis due to *Candida albicans* in Ethiopia. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 36:32–34

- Park YW, Haenlein GF (2008) Handbook of milk of non-bovine mammals. Blackwell Publishing, Wiley, Ames, Iowa
- Qvirist LA, De Filippo C, Strati F, Stefanini I, Sordo M, Andlid T, Felis GE, Mattarelli P, Cavalieri D (2016) Isolation, identification and characterization of yeasts from fermented goat milk of the Yaghnob Valley in Tajikistan. *Front Microbiol* 7:1690
- Rahman N, Xiaohong C, Meiqin F, Mingsheng D (2009) Characterization of the dominant microflora in naturally fermented camel milk shubat. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1941–1946
- Rodrigues C, Yarrow D, Spencer-Martins I (1996) Nuclear DNA comparisons among strains of *Pichia membranifaciens*. In: Abstr. 9th International symposium on yeasts, 1996. 31
- Roostita R, Fleet G (1996) The occurrence and growth of yeasts in camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* 28:393–404
- Schwan RF, Almeida EG, Souza-Dias MAG, Jespersen L (2007) Yeast diversity In Rice–Cassava fermentations produced by the Indigenous Tapirapé people of Brazil. *FEMS Yeast Res* 7:966–972
- Siboukeur O (2007) Etude Du Lait Camelin Collecté Localement : Caractéristiques Physico-Chimiques Et Microbiologiques ; Aptitudes A La Coagulation. Thèse De Doctorat, Institut National Agronomique, El-Harrach-Algeria, p 22
- Singh Y, Gupta R (2016) Novel S-enantioselective lipase TALipB from *Trichosporon asahii* MSR54: heterologous expression, characterization, conformational stability and homology modeling. *Enzyme Microb Technol* 83:29–39
- Suzzi G, Schirone M, Martuscelli M, Gatti M, Fornasari ME, Neviani E (2003) Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Res* 3:159–166
- Tourette I, Messad S, Faye B (2002) Impact Des Pratiques De Traite Des Eleveurs Pur La Qualité Sanitaire Du Lait De Chamelle En Mauritanie. *Revue Élev Méd Vét Pays Trop* 55:229–233
- Vacheyrou M, Normand AC, Guyot P, Cassagne C, Piarroux R, Bouton Y (2011) Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbiol* 146:253–262
- Valle RS, Ramos LS, Reis VJ, Ziccardi M, Dornelas-Ribeiro M, Sodr  CL, Branquinha MH, Santos ALS (2017) *Trichosporon asahii* secretes a 30-kDa aspartic peptidase. *Microbiol Res* 205:66–72
- Vasdinyei R, Deak T (2003) Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int J Food Microbiol* 86:123–130
- Watanabe K, Fujimoto J, Sasamoto M, Dugersuren J, Tumursuh T, Demberel S (2008) Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in airag and tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1313–1325
- Yam BZ, Khomeiri M, Mahounak AS, Jafari SM (2015) Isolation and identification of yeasts and lactic acid bacteria from local traditional fermented camel milk, Chal. *J Food Process Technol* 6:460. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000460>. <https://www.omicsonline.org/open-access/isolation-and-identification-of-yeasts-and-lactic-acid-bacteria-from-local-traditional-fermented-camel-milk-chal-2157-7110-1000460.php?aid=56398>
- Zaragoza CS, Olivares RAC, Watty AED, De La Peña Moctezuma A, Tanaca LV (2011) Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican high plateau. *Rev Iberoam Micol* 28:79–82
- Zhang Y, Li H, Yang R, Wang C (2016) Study on Antioxidant Enzymatic Activities of *Trichosporon asahii*. *Indian J Microbiol* 56 : 445–450

Publication 2

The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*

The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*

Soufian Ider^{a,b,1,2}, Yanath Belguesmia^{a,*,1}, Guillaume Cazals^{c,1}, Rabah Boukherroub^d,
Françoise Coucheney^a, Mabrouk Kihal^b, Christine Enjalbal^c, Djamel Drider^a

^a *BIOECOAGRO Unit of Research INRAE 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV – Institut Charles Viollette, F-59000, Lille, France*

^b *Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran 1, 31100, Oran, Algeria*

^c *Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Université de Montpellier, 34000, Montpellier, France*

^d *Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, UMR 8520, Université de Lille, 59655, Villeneuve d'Ascq, France*

* Corresponding author.

¹ Contributed equally to this work.

² Present address. Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, 47000, Ghardaïa, Algeria.

Abstract

Six *Trichosporon asahii* strains designated ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 and ICVY026 were isolated from camel milk and studied for their inhibitory activities against a large number of fungi and bacteria as target organisms. Only strain ICVY021 was able to inhibit *Kocuria rhizophila* CIP 53.45, through production of an extracellular heat-stable, proteinaceous antibacterial peptide, with partial amino acid sequences of PPFPK and CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV(L/I)(K/Q), determined using LC/MS/MS. This peptide, named oranicin P16, was thought to impede the cell-division mechanism. The anti-*K. rhizophila* activity was confirmed, *in situ*, using skim milk as a food matrix. *T. asahii* ICVY021 did not show any hemolytic activity or any cytotoxicity effect against eukaryotic Caco-2 cells. *T. asahii* ICVY021 was sensitive to azoles antifungal compounds, but not to 5-fluorocytosine and anidulafungin.

Keywords: *Trichosporon asahii*, Yeast antimicrobial peptide, *Kocuria rhizophila*, Camel milk

1. Introduction

Isolation and characterization of non-conventional yeasts from foods and their applications as biopreservative agents has received limited investigation. Camel milk was recently targeted as a potential source of autochthonous non-conventional yeasts and was shown to have *Trichosporon asahii* strains (Ider, Belguesmia, Coucheney, Kihal, & Drider, 2019). *Trichosporon* spp. are opportunistic organisms that are distributed throughout nature (Colombo, Padovan, & Chaves, 2011), but their presence in the human microbiome seems to be limited (Mariné, Brown, Riaño-Pachón, & Goldman, 2015). These basidiomycetes yeast-like anamorphic organisms can be found in different ecological niches including the skin and gut of healthy individuals (Cho, Matsukura, & Sugita, 2015; Zhang, Sugita, Tsuboi, Yamazaki, & Makimura, 2011), dairy products as spoilage yeasts (Garnier, Valence, & Mounier, 2014), soft churupi soup, Indian fermented foods, and camel milk (Ider *et al.*, 2019; Rai, Kumari, Sanjukta, & Sahoo, 2016), indicating their capabilities of adaptation and thriving in various host and environmental niches.

Fungal spoilage is a major concern for foods and causes between 5 and 10% of the world's food production losses (Garnier *et al.*, 2014). The presence of such microorganisms in dairy and derivative products could lead to a visible growth of fungi or to the production of unwanted metabolites causing organoleptic deterioration, and possibly a safety hazard (Hymery *et al.*, 2014; Ledenbach & Marshall, 2010). The use of biopreservation has become another way to handle/control the development of spoilage microorganisms as well as that of food-borne pathogens (Garnier *et al.*, 2014).

T. asahii is also emerging as a biotechnological tool for its ability to decontaminate polluted environments by accumulating large amounts of oils (Ageitos, Vallejo, Veiga-Crespo, & Villa, 2011), and also converting isoeugenol into vanillin (Ashengroph & Amini, 2017). Strains of *T. asahii* were reported to produce lipase (Singh & Gupta, 2016), aspartic-type peptidase (Valle *et al.*, 2017), and antioxidant molecules (Zhang, Li, Yang, & Wang, 2016). Furthermore, the *T. asahii* GSY10 strain was able to produce lipid from molasses, and was suggested as a feed supplement in dairy cattle (Paserakung, Pattarajinda, Vichitphan, & Froetschel, 2015). Chen and Chou (2017) reported the antagonistic effects of *T. asahii* strains against fungi through production of extra-cellular pH-dependent compounds.

In this study, the inhibitory properties of 6 *T. asahii* strains isolated from camel milk that had been collected from arid and semi-arid regions of Algeria (Ider *et al.*, 2019), were tested against a range of target organisms including fungi and bacteria. Only *T. asahii* ICVY021

showed an inhibition against *Kocuria rhizophila* CIP 53.45 through production of an extracellular, heat-stable and proteinaceous peptide. *K. rhizophila*, which belongs to the Micrococcaceae family, was described as a contaminant of camel milk (Elhaj, Freigoun Somaya, & Mohamed, 2013; Takarada *et al.*, 2008) with enzymatic activities able to induce spoilage of dairy product (Pukančíková, Lipničánová, Kačániová, Chmelová, & Ondrejovič, 2016). Moreover *K. rhizophila* is responsible for human infection (Moissenet *et al.*, 2012), and for diseases in rainbow trout or brown trout (Pekalaa *et al.*, 2018). Therefore this study aimed at characterizing the antibacterial peptide, designated oranicin P16, produced by *T. asahii* strain ICVY021.

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions and media

T. asahii strains ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 and ICVY026 were isolated from camel milk in arid and semi-arid regions of Algeria (i.e., Béchar, Biskra, Djelfa, El-Bayadh and Ghardaïa (2), respectively) (Ider *et al.*, 2019). *T. asahii* ICVY021 was chosen because of its antimicrobial activity, while the other 5 strains were randomly isolated among many other strains without antimicrobial activity. Strains were plated onto YEG agar (5.0 g.L⁻¹ yeast extract; 20.0 g.L⁻¹ glucose; 15.0 g.L⁻¹ agar-agar, Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO, USA), supplemented with 0.1% (w/v) chloramphenicol (Sigma Aldrich). The plates were incubated for 3 days at 25 °C. Yeast colonies were purified by streaking onto YEG agar and stored at -80 °C in YEG broth supplemented with 30% (v/v) glycerol for a maximum of three months.

2.2. Genomic DNA extraction

Total DNA was extracted using the Bustin's method (Harju, Fedosyuk, & Peterson, 2004). Cells from 1.5 mL of the overnight yeasts cultures in YEG broth were pelleted in a microcentrifuge tube at 8000 g (8680 rpm in a FA-45-30-11 rotor, Model 5804R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) for 10 min at 4 °C. The cell pellets were suspended in a lysis buffer (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl at pH 8.0; 0.1 mM EDTA, Sigma Aldrich), and disrupted by two repetitive heat shock cycles at -80 °C (for 2 min) and 95 °C (for 1 min). DNA was extracted using the chloroform procedure as follows: 200 µL of chloroform (Sigma Aldrich) was added to the tubes and Vortexed (Vortex Genie 2, Dutscher, Brumath, France) for 2 min and centrifuged at 20,000 g, 3 min at room temperature (20–25 °C).

The aqueous layer was transferred to a tube containing 400 µL of ice-cold 100% ethanol (Sigma Aldrich). The samples were precipitated for 5 min at room temperature, and centrifuged at 20,000 g for 5 min at room temperature. Supernatants were pipetted and the DNA pellets were washed with 0.5 mL of 70% ethanol followed by drying at 37 °C. DNA was re-suspended in 10 mM Tris-EDTA buffer (pH 8.0, Sigma Aldrich) and its concentration determined with a Nanodrop Biowave II (Biochrom, Harvard, UK), by measuring their absorbance at 260nm UV wavelength.

Table 1

Primers and PCR programs used in this work.

PCR objective	Primer sequences	Source of primers	PCR program
Amplification 26S rDNA	NL-1 (Forward) 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G-3' LS-2 (Reverse) 5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'	Eurofins Germany	Initial denaturation 95°C/5 min Followed by 30 cycles including <ul style="list-style-type: none"> • Denaturation 95°C/1 min • Annealing 52 °C/45 s • Elongation 72°C/1 min Final elongation 72°C/1 min
Amplification ITS1-5.8S-ITS2	ITS1 (Forward) 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' ITS4 (Reverse) 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	Eurofins Germany	Initial denaturation 95°C/5 min followed by 35 cycles <ul style="list-style-type: none"> • Denaturation 94 °C/30 s • Annealing 57 °C/30 s • Elongation at 72°C/1 min Final elongation 72°C/5 min

2.3. Yeast identification using an API 20C AUX strip and molecular methods

The API 20C AUX identification procedure was done in accordance with the manufacturer's instructions (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Cultures of ~10⁶ colony forming units (CFU) mL⁻¹ were prepared in YEG broth, and 5 drops were dispersed in an API C medium vial provided by the manufacturer and homogenized by Vortexing. After homogenizing, the inoculum was deposited on the wells of the test strip, and incubated at 25 °C for 48 h. The wells with growth were allocated a plus sign, whereas those with the absence of growth were allocated a minus sign. The results were transformed into numerical codes using a correspondence table provided by the manufacturer. The isolates were identified using the 20C analytical profile index (API 20C) available online (<https://apiweb.biomerieux.com/>).

The sequences of the 26S rDNA and ITS1-5.8-ITS2 were determined using the polymerase chain reaction (PCR) products gathered from the genomic DNA of the yeast cells, extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). The sequencing of the 26S rDNA and ITS1-5.8-ITS2 were done using primers and programs shown in Table 1. The PCR products were separated on a 1% agarose gel (Bio-Rad, Hercules, CA,

USA) labelled with 0.05% GelRed (Thermo Fisher Scientific Co. Waltham, MA, USA) for 2 h at 100 V. The gels were analysed using PyElph 1.4 software available online (<https://pyelph.software.informer.com/1.4/>).

The PCR products were sequenced at Eurofins (Hamburg, Germany). A blast search of the nucleotide sequences was done through the nucleotide Blastn software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) of the US National Center for Biotechnology Information (NCBI). The nucleotide sequences obtained for these samples were deposited at the NCBI database with the accession numbers given in Table 2.

Table 2

API 20C AUX and molecular identifications of *Trichosporon asahii* strains from camel milk.

PCR objective	Strain	API 20C (%identity)	26 rDNA (% identity) / Accession number	ITS1-5.8-ITS2 region (% identity)/ Accession number	26 rDNA Accession numbe	ITS1-5.8-ITS2 region Accession number
P16	ICVY021	<i>T. asahii</i> 100%	<i>T. asahii</i> 100%/(MG707737.1)	<i>T. asahii</i> 100%/(KP162247.1) ¹²	MH193364	MH188544
PF1	ICVY022	<i>T. asahii</i> 100%	<i>T. asahii</i> 100%/(JQ665245.1) ¹²	<i>T. asahii</i> 100%/(KP162247.1) ¹²	MH193366	MH188546
KH4(4)	ICVY023	<i>T. asahii</i> 99,3%	<i>T. asahii</i> 100%/(MG707737.1) ¹²	<i>T. asahii</i> 100%/(KC127676.1) ¹²	MH193368	MH188548
D1 (11)	ICVY024	<i>T. asahii</i> 90,5%	<i>T. asahii</i> 99%/(NG_055732.1) ¹²	<i>T. asahii</i> 100%/(KP162247.1) ¹²	MH193365	MH188545
SA1 (4)	ICVY025	<i>T. asahii</i> 100%	<i>T. asahii</i> 99%/(MG707737.1) ¹²	<i>T. asahii</i> 100%/(KC127676.1) ¹²	MH193367	MH188547
SA	ICVY026	<i>T. asahii</i> 100%	Nd	Nd	Nd	Nd

Legend. Nd: not determined.

2.4. Repetitive-element-palindromic-PCR (Rep-PCR) fingerprints

The Rep-PCR was done with the unique primer 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3' (GTG5, Eurofins) (Ceugniez, Drider, Jacques, & Coucheney, 2015; Ouoba *et al.*, 2010, 2012). The PCR program used included an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, hybridation at 40 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 8 min. The final elongation was done for 16 min at 72 °C. For each reaction 150 ng of DNA, master mix PCR 2X (Thermo Fisher Scientific), ultra-pure water (Thermo Fisher Scientific) and 2 µM primer were used. The PCR products and 5 µL of DNA marker (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), at 0.1 µg µL⁻¹, were deposited and separated on a 1% agarose gel labelled with 0.05% GelRed for 2 h at 100 V. The gels were visualized and photographed with a Gel-Doc 2000® (Bio-Rad), and the DNA profiles (size and number of amplicons) were established with GelCompar II (v6.6.11) software (Biosystematica, Ceredigion, Wales, UK).

2.5. Assessment of antagonistic properties of *T. asahii* strains

The inhibitory properties of culture supernatants of *T. asahii* ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 and ICVY026 strains were assessed against different fungi and Gram-negative and Gram-positive bacteria, as target organisms. These included *Candida albicans* ATCC 10231, *Fusarium oxysporum* (Charles Viollette Institute collection, Lille University, Villeneuve d'Ascq, France), *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enterica* subs. *Enterica* serotype *Newport* (Bioecoagro Lab collection, Lille University), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* 162 (Al-Seraih *et al.*, 2017). *K. salsicia* and 8 other *K. rhizophila* strains isolated from a meat grinder in a Danish Slaughter-house, and kindly provided by Professor J. Herschend (Copenhagen, Denmark) were also tested. *T. asahii* strains were grown in YEG broth for 48 h at 25 °C with shaking (160 rpm). Culture supernatants (CS) were obtained by centrifugation at 6000 g (6690 rpm in a FA-45-6-30 rotor), for 10 min at 4 °C, and stored at this same temperature for a maximum of 2 days before use. One mL of target strain suspension in Mueller Hinton (MH) broth (Sigma Aldrich), previously adjusted at OD_{600nm} to 0.0025, was flooded on MH agar plates. After drying the plates at room temperature in a laminar flow hood (ADS Laminaire, Aulnay-sous-bois, France) for < 20 min, wells of ~6 mm were made with sterile pipette tips (VWR, Radnor, PA, USA) in each plate, and filled with 50 µL of CS. After 2 h of incubation at 4 °C, allowing diffusion of CS, plates were incubated at 37 °C for 48 h. In all these experiments, the presence or absence of inhibition zones was visually determined.

2.6. Purification of the inhibitory compound from *T. asahii* ICVY021

The active CS obtained after the culture of *T. asahii* ICVY021 was purified using Amberlite® XAD®-2 polymeric adsorbent resin (Sigma Aldrich). CS (50 mL) were mixed with the XAD resin (2 g) and incubated overnight at 20 °C with orbital agitation at 100 rpm. The mixture was vacuum filtrated through a 0.2 µm filter (VWR) and the filtrate removed. The XAD resin was resuspended and washed twice with 20 mL of ultrapure water (Thermo Fisher Scientific), and incubated at 20 °C with agitation at 100 rpm for 20 min. The XAD resin containing the active compound(s) was separated again by vacuum filtration as described above and resuspended in a mix of 10 mL of ultrapure water + 10 mL methanol, and incubated at 100 rpm, 20 °C for 20 min. The water/methanol phase containing the active compound, designated oranicin P16, was recovered using a syringe after the resin settled, and the solvent was removed using a speed vacuum concentrator (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific).

2.7. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of the purified inhibitory compound oranicin P16 produced by *T. asahii* ICVY021

Following the growth of *K. rhizophila* CIP 53.45 in MH medium at 37 °C, 1 colony was randomly chosen and added to 10 mL of MH broth. Samples of 10 µL of this bacterial suspension were added to the 96 wells of bioassay microplates containing serial dilutions of active compound prepared as indicated above. The MIC was defined as the lowest concentration of this active compound that inhibited the visible growth of the target strain after overnight incubation at 37 °C.

The MBC was determined by subculturing the inoculated samples, used for the MIC assay, in MH agar without oranicin P16. The MBC was defined as the concentration of active compound that reduced the viability of the initial inoculum of *K. rhizophila* CIP 53.45 by $\geq 99.9\%$, as determined by counting the cells on MH plates, compared to the untreated inoculum tested using the same conditions.

2.8. In situ activity of oranicin P16 in skim milk

To assess the in-situ activity of the purified active compound, a time-killing experiment was done. Tubes containing a commercial sterilized skim milk (Carrefour®, Carrefour group, France, Boulogne-Billancourt, France) were supplemented with 10% (v/v) of PBS, or nisin (Sigma Aldrich) at a final concentration of 1 µg mL⁻¹, or with the active compound oranicin P16 at the MIC value. A volume of 20 µL of a *K. rhizophila* CIP 53.45 suspension of $\sim 2 \times 10^9$ CFU mL⁻¹ in PBS, as determined by cell-counting, was introduced in the prepared tubes containing 2 mL of the supplemented skim milk with PBS (control), nisin or oranicin P16, and incubated at 37 °C for 6 h. The killing kinetics of the nisin and the oranicin P16 were monitored using viable bacterial counts on agar plates compared to the control. Aliquots were taken at 0, 2, 4 and 6 h, and serially diluted in saline solution for determination of viable counts. Diluted samples (100 µL) were plated on the MH agar plates and colonies were counted after overnight incubation at 37 °C.

2.9. Molecular mass and amino acids sequence of the purified inhibitory compound

Liquid chromatography - mass spectrometry (LC/MS) analyses, using positive mode with electrospray ionisation (ESI) and high resolution time of flight (TOF) mass analyzer, were done using an Acquity H-Class (Waters Corp. Milford, MA, USA) system equipped with a Kinetex EVO C18 column (1.9 mm particle size, 150 × 2.1 mm), (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

The mobile phase A consisted of water while mobile phase B was acetonitrile both containing 0.1% formic acid. The gradient started at 5% mobile phase B and increased to 100% mobile phase B over 40 min. The flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and the eluent was directed to the atmospheric pressure ionisation source of the Synapt G2-S (Waters) tandem hybrid Quadrupole-TOF mass spectrometer operating in positive electrospray ionisation mode. Capillary and cone voltages were 3000 and 30 V, respectively. Source and desolvation temperatures were 120 and 450 °C, respectively. The molecular weight of the purified peptide was determined by the deconvolution of the resulting signal. MS/MS analyses were done using collision induced dissociations (CID) fragmentation at 40 eV. All data were acquired and processed using Masslynx 4.2 software (Waters). Then the sequences were blasted using the NCBI protein database using BlastP online software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The matching peptides, with highest sequences homology, were then compared manually.

2.10. Transmission electron microscopy (TEM) of *K. rhizophila* CIP 53.45 treated with the inhibitory compound

K. rhizophila CIP 53.45 was grown in 2 mL MH medium overnight and divided equally in two different tubes after Vortexing. After centrifugation at 8000 g at 4 °C for 10 min, the supernatants were discarded and the cell pellets were washed twice with PBS. In the first tube, the pellets were resuspended and treated with the oranicin P16 at MBC, determined as described previously, and resuspended in sterile ultra-pure water. In the second tube (control tube), the pellets were re-suspended in sterile ultrapure water, and the samples were incubated overnight at 37 °C.

For TEM, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Merck Co. Kenilworth, NJ, USA) buffered with 0.1 M sodium cacodylate (Merck), post-fixed in 1% osmium tetroxide (EMS, Hatfield, PA, USA) in the same buffer and “en bloc” stained with 2% uranyl acetate (VWR). After washing with acetonitrile and air-drying, samples were embedded in epon-like resin (EMbed-812, EMS). Ultrathin sections of ~90 nm was cut using a Leica UC7 ultramicrotome (Wetzlar, Germany) and collected on 150 mesh hexagonal barred copper grids. The samples were observed at 200 kV using a Jeol JEM-2100 microscope (Jeol Ltd. Tokyo, Japan) coupled with a Gatan Orius SC200D camera (Gatan Inc. Oxford, UK) with magnification of ~20,000 to 40,000x.

2.11. Hemolysis and resistance to antifungal drugs of *T. asahii* ICVY021 antagonistic strain

The hemolytic activity of antagonistic strain was determined by streaking fresh colonies on blood agar plate (VWR). The plate was incubated at 37 °C for 24–48 h. The development of a clear zone around the colonies was considered as a positive result. The in vitro studies of sensitivity to amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazol, voriconazol, caspofungin, posaconazol and anidulafungin (bioMérieux) were done using the E-test method (bioMérieux) according to CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) guidelines. Briefly, an inoculum of *T. asahii* ICVY021 was prepared and adjusted to $\sim 10^6$ cells mL⁻¹. A sample of 0.5 mL of this suspension was inoculated onto plates containing RPMI 1640 agar (1.5%) (Sigma Aldrich) with 2% glucose (Sigma Aldrich) using a sterile cotton swab. After a period of 15 min, the E-test strips (5.7×0.5 cm) containing the antifungal drugs, with concentrations ranging from 0.002 to 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, were applied on the plates (9 cm diameter). The MIC which is the lowest concentration allowing the complete inhibition of yeast growth was obtained after 48 h of incubation at 25 °C.

The interpretation of MIC values was done using the data given for *T. asahii* by Kanafani and Perfect (2008), in accordance with the recommendations approved by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2017) and the CLSI (CLSI, 2018) using *Candida albicans* as a reference strain (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012). According to these recommendations, the *T. asahii* was considered resistant to the antifungal agents tested when their MIC were equal or higher to the following cut off concentrations: 2 mg L⁻¹ for amphotericin B, 50 mg L⁻¹ for 5-fluorocytosine, 8 mg L⁻¹ for fluconazol, 1 mg L⁻¹ for voriconazol, 1 mg L⁻¹ for caspofungin, 0.06 mg L⁻¹ for posaconazol and 1 mg L⁻¹ for anidulafungin.

2.12. Cytotoxicity assay

Intestinal human colorectal tumour Caco-2 cells (Sigma Aldrich) were grown in 96-well cell culture plates and pre-incubated for 7 days at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific), 2 mM glutamine (Pan-Biotech GmbH), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of penicillin and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin (Pan-Biotech GmbH). A 24 h old culture of *T. asahii* ICVY021 were diluted to 2×10^8 CFU mL⁻¹ in antibiotic and serum free DMEM, then 100 μL of this suspension was added to each well containing $\sim 2.10^5$

Caco-2 cells. Furthermore, the cytotoxicity on the Caco-2 cells was measured after 24 h of contact by determining the dehydrogenase activity of mitochondria with the CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay (Dojindo, Kumamoto, Japan). Briefly, after incubation cells were washed with DMEM without any supplementation to remove non-adherent yeasts. To eliminate adherent yeasts, 50 μL of amphotericin B (Sigma Aldrich), at a final concentration of 5 mg L^{-1} in PBS, were added to each well. After 2 h of incubation at 37 °C, the solution of amphotericin B was removed and the wells were filled with 100 μL of DMEM supplemented with 5 μL of CCK-8 (Dojindo) reagent and incubated for an additional 2 h at 37 °C. Wells with Caco-2 cells treated with Triton X100 solution (Sigma Aldrich), diluted to a final concentration of 0.1% in DMEM were used as a positive control of cytotoxicity whereas wells with non-treated Caco-2 cells served as a negative control. An additional negative control using wells with Caco-2 cells treated with amphotericin B, with the same conditions as described before, but not exposed to yeast was also used.

The CCK-8 reagent was used at 5% (v/v) final concentration to evaluate the viability of Caco-2 cells by determining the activity of cellular dehydrogenase, resulting in an orange colored formazan from the water-soluble tetrazolium salt: WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)2H tetrazolium, monosodium salt). The formation of formazan was measured at 450nm using a microplate reader (Xenius SAFAS, Monaco), and compared with the absorbance of non-treated cells considered as the control.

2.13. Adhesion assay

The adhesion abilities of *T. asahii* ICVY021 on Caco-2 cells were determined as reported by Ait Seddik, Bendali, Cudennec, and Drider (2017). Caco-2 cells/well (4×10^4) were seeded in 24-well tissue culture plate, incubated for 7 days at 37 °C (5% CO₂ and 95% air). Cells of *T. asahii* ICVY021 grown in YEG broth for 48 h at 25 °C were harvested by centrifugation at 6000 g at 4 °C for 10 min, and resuspended in DMEM without FBS and antibiotics to a final concentration of 10^5 CFU/well. To determine the effect of proteins or carbohydrates on the adhesion process of *T. asahii* ICVY021 with confluent Caco-2 monolayers, the yeast cells were treated with trypsin from porcine pancreas (Sigma Aldrich) at a final concentration of 2.5 mg mL^{-1} for 1 h at 37 °C, or with 50 mM of periodic acid (Sigma Aldrich) in 10 mM PBS (pH 7.4) for 30 min at 37 °C Ait Seddik *et al.* (2017). Both samples were washed twice with PBS and resuspended in DMEM without FBS and antibiotics. Untreated yeast-cells at $\sim 10^5$ CFU/well or

treated ones with trypsin or periodic acid were applied to confluent Caco-2 cells and incubated for 2 h at 37 °C (5% CO₂ and 95% air). The Caco-2 monolayers were washed twice with 500 µL of PBS to remove non-adherent yeast cells. Lysates obtained after incubation with Triton X100 (Sigma Aldrich) at 0.1% (v/v) for 15 min, were serially diluted and plated on YEG agar to determine the number of adherent yeast cells, untreated and treated with trypsin or periodic acid.

2.14. Statistical analysis

Data of cytotoxicity and adhesion assays were expressed as a mean ± standard error calculated over three independent experiments. Analysis of statistical significance was done using one way ANOVA and the post-hoc Tukey Test ($P < 0.05$) using XL-STAT (Addinsoft, Bordeaux, France).

3. Results

3.1. API 20C AUX strips and molecular methods are reliable methods for identification of *T. asahii* strains

After 72 h at 25 °C colonies of *T. asahii* ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 and ICVY026 on YEG-agar plates were white, dried and wrinkled with irregular margins (Fig. 1). All the strains were identified as *T. asahii* using API 20C AUX strips and molecular methods. The scores obtained using the API 20C AUX system ranged from 90 to 100% (Table 2), while those obtained after blasting 26 rDNA and ITS1-5.8-ITS2 regions sequences ranged between 99 and 100% (Table 2).

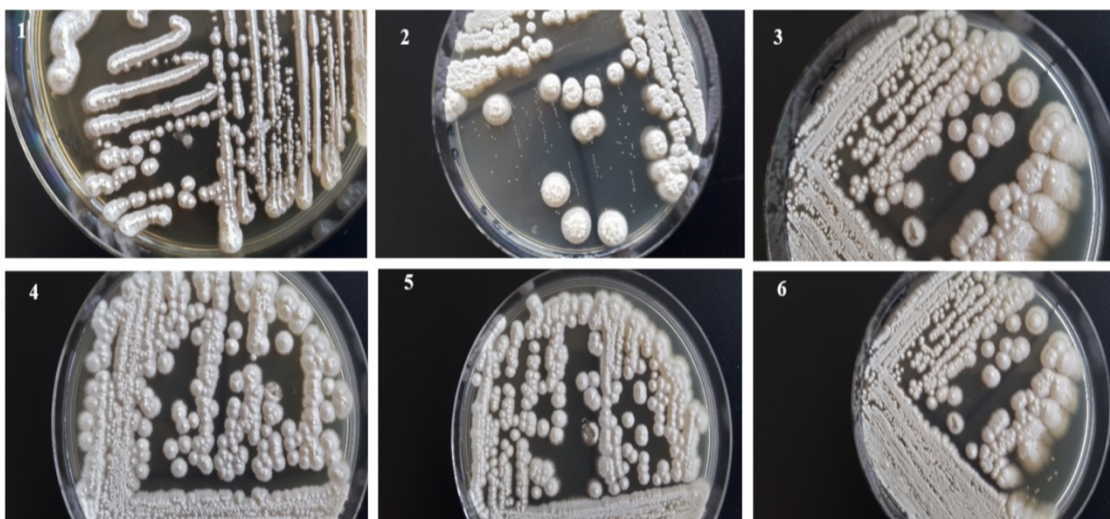


Fig 1. Colonies morphologies of *T. asahii* strains grown on solid YEG media for 72h at 25°C. (1) ICVY021, (2) ICVY022, (3) ICVY023, (4), ICVY024 (11), (5) ICV025, (6) ICVY026.

3.2. *T. asahii* ICVY021 showed a slightly different DNA pattern

The analysis of rep-PCR DNA fingerprints and their related dendrogram delineated two main groups of yeasts. The first is composed of ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025, ICVY026 strains, and the second contains only *T. asahii* ICVY021 (Fig. 2).

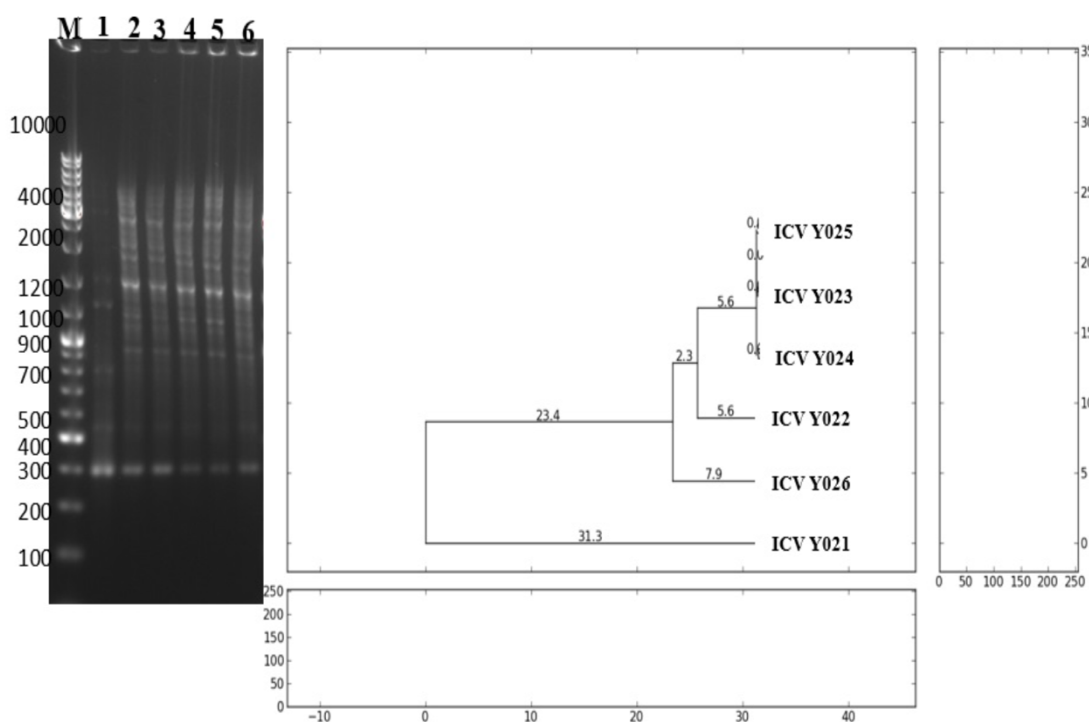


Fig. 2. Rep-PCR and dendrogram resulting from genomic DNA extracted from cells of *T. asahii* strains. M: DNA marker. L1: ICVY021, L2: ICVY026, L3: ICVY022, L4: ICVY024, L5: ICVY023 and L6: ICVY025.

3.3. *T. asahii* ICVY021 is the only strain with inhibitory properties

The inhibitory properties of *T. asahii* strains were tested against different organisms including fungi, and both Gram positive and Gram negative bacteria. CS were tested as sources of inhibitory compound(s). Only *T. asahii* ICVY021 showed an inhibition zone against *K. rhizophila* CIP 53.45 (Fig. 3). The CS was heat-treated for 10 min at 60, 80 and 100 °C, and tested against *K. rhizophila* CIP 53.45. The antibacterial activity had slightly decreased with treatment at 100 °C and 80 °C but not at 60 °C (data not shown). Protease treatments abolished the anti-*K. rhizophila* CIP 53.45 activity, suggesting a proteinaceous active compound.

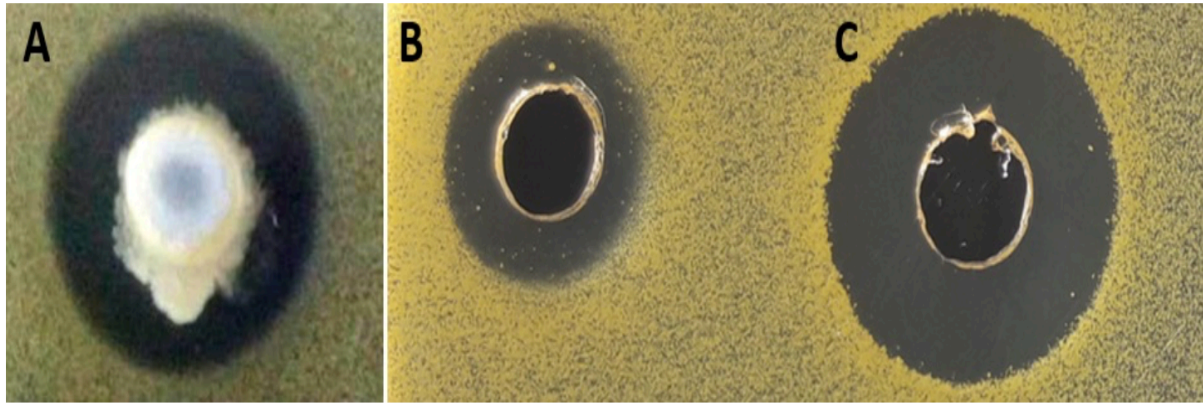


Fig. 3. A: Halo inhibition of *K. rhizophila* CIP 53.45, upon addition of 50 μ L of culture supernatant from *T. asahii* ICVY021 grown on YEG agar medium, at 25 $^{\circ}$ C for 48 h, with shaking (160 rpm). B: Inhibition attributed to purified oranicin P16 produced by *T. asahii* YCV021 and C: To nisin (25 μ g mL $^{-1}$).

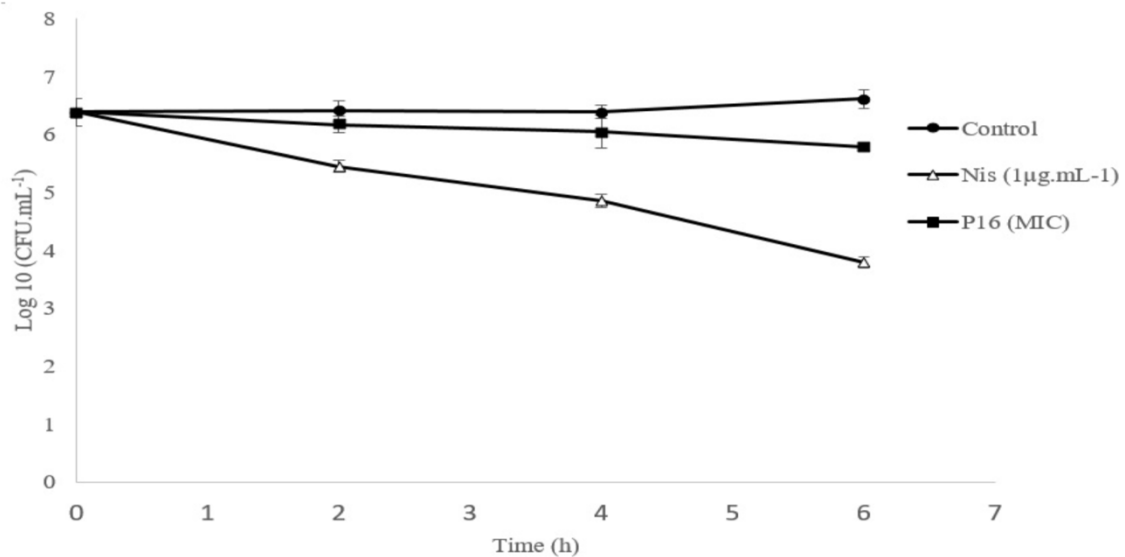


Fig. 4. *In situ* activity of nisin (Nis) and purified oranicin P16 inhibitory compound produced by *T. asahii* ICVY021 while studying *K. rhizophila* CIP 53.45 killing curves.

For the *in situ* assessment of this activity, killing curves were obtained in a commercial skim milk using *K. rhizophila* CIP 53.45 as a target organism, treated or not with nisin at 1 μ g mL $^{-1}$, and the purified oranicin P16, used at the MIC value (215 μ g mL $^{-1}$). Microbial counts were measured as CFU mL $^{-1}$ and the resulting averaged data were transformed to Log CFU mL $^{-1}$. The cells number in the treated skim milk with oranicin P16 decreased by \sim 1 Log CFU mL $^{-1}$, whereas the untreated sample was unaffected showing a growing population, which reached 6.61 Log CFU mL $^{-1}$ (Fig. 4). Nevertheless, nisin showed the strongest inhibitory activity with a rapid decreasing number of the viable and cultivable cells, by 3 Logs after 6 h, therefore killing > 99.9% of the initial bacterial populations.

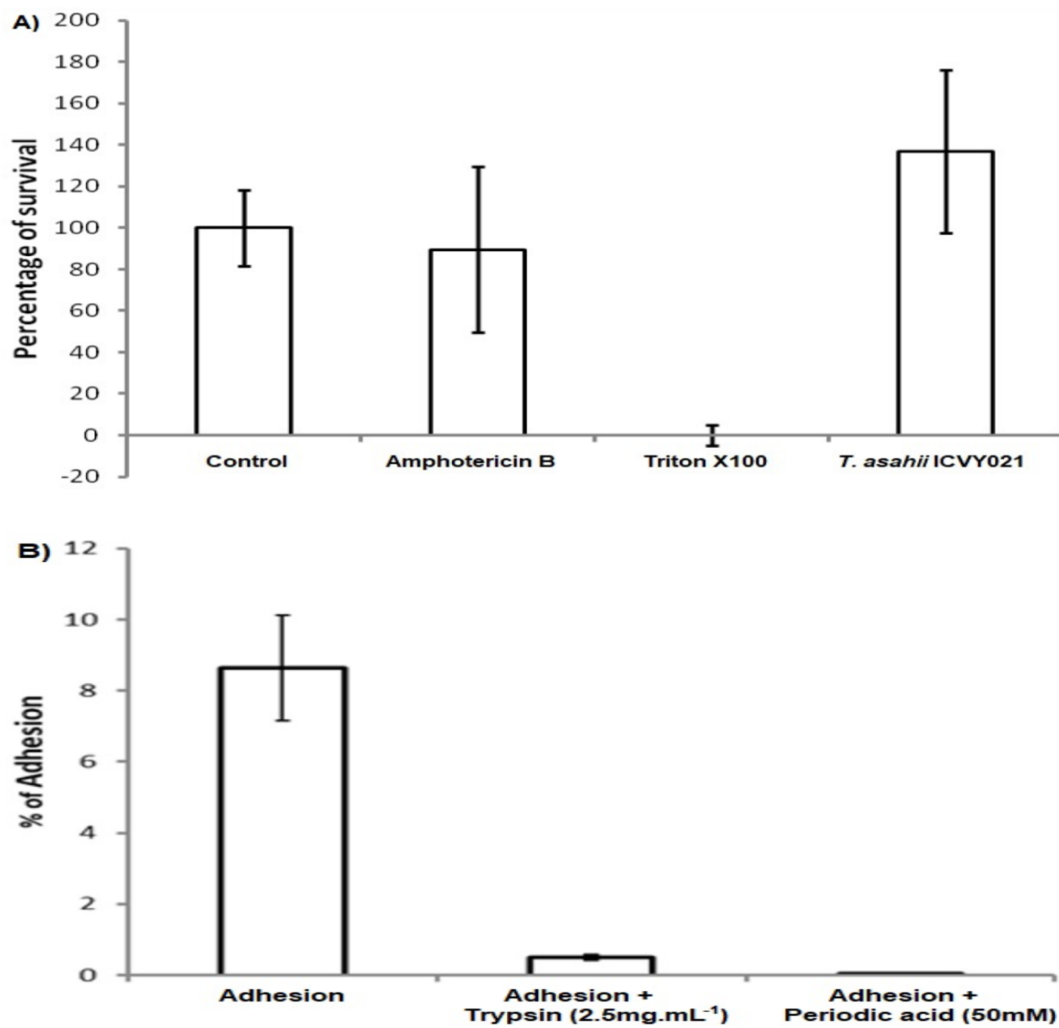


Fig. 5. A) Percentage of living Caco-2 cells after contact with *T. asahii* ICVY021 strain for 24 h with 1:100 (Caco 2:yeasts) cells ratio. The survival of Caco- 2 cells was assessed by determination of dehydrogenase activity compared to control cells. B) Effect of treatment with trypsin (2.5 mg mL⁻¹) or periodic acid (50 mM) on adhesion of *T. asahii* ICVY021. Data were expressed in percentage of the total yeast cells poured on a Caco-2 confluent monolayer. Values \pm SD are means of triplicates. Columns with different number of asterisks (*) are significantly different ($P < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test.

3.4. Resistance to antifungal drugs, hemolytic and cytotoxic effects of *T. asahii* ICVY021

T. asahii ICVY021 was tested against 6 antifungal drugs routinely used in treatment of yeast infections. The MIC values obtained were 0.125 mg L⁻¹ for amphotericin B, 200 mg L⁻¹ for 5-fluorocytosine, 0.380 mg L⁻¹ for fluconazole, 0.02 mg L⁻¹ for voriconazole, 0.047 mg L⁻¹ for posaconazole and 32 mg L⁻¹ for anidulafungin. *T. asahii* ICVY021 do not show hemolytic activity, as no blood hemolysis was observed around the grown colonies after 24–48 h of growth at 25 °C on blood agar plate. Likewise, no cytotoxic effect of *T. asahii* ICVY021 was

observed with Caco-2 cells after 24 h of contact with *T. asahii* (Fig. 5A). Taken together, these results began to establish the safety of *T. asahii* ICVY021.

The adhesion ability was also investigated using the human cell line Caco-2. As shown in Fig. 5B, the results showed that around 10% of *T. asahii* ICVY021 cells were adhesive. This score is weak compared to those for dairy yeasts (Živković *et al.*, 2015), but remains higher than that observed for *Candida* species (Al-Seraih, Flahaut, Krier, Cudenneq, & Drider, 2015). Moreover, the treatment with trypsin or periodic acid led to a decrease of the percentage of adhesive *T. asahii* ICVY021 to <1%.

3.5. The inhibitory proteinaceous sample contains a peptide with a molecular weight of 4607 Da

To identify the compound responsible for the antimicrobial activity, the purified inhibitory proteinaceous sample was analysed using LC/MS/MS with a reversed-phase gradient designed to separate a wide range of organic compounds. Among all the chromatographic peaks detected, one of them was found to show the features of a peptide sequence. Indeed, the corresponding mass spectrum obtained in the positive mode with ESI and high resolution TOF mass analyser showed multiple charged molecular ions ranging from +3 up to +6 protonations, as seen in Fig. 6 (top). These MS signals were deconvoluted to obtain the molecular weight of 4607 Da as shown in Fig. 6 (bottom). The sequencing of such a long peptide was directly attempted using LC/MS/MS with CID without any proteolytic step. During this experiment, the selected cations from the quadrupole (Q) collide with argon gas in the collision cell to induce fragmentation. Product ions derived from CID were then mass analysed by TOF analyser. Although partial sequence coverage was expected from fragmentation of a very large peptide with these low energy CID conditions (Mouls, Aubagnac, Martinez, & Enjalbal, 2007), the aim of such identification study was to propose a sequence tag that can be used for further search of known peptides and proteins in databases. For that purpose, all protonated molecular ions were dissociated but only the penta-charged ion $(M + 5H)^{5+}$ detected at m/z 922.6 provided many fragments that allowed the identification of the PFPK(K/Q) sequence tag. The first series of fragment ions without decarbonylation (Fig. 7) were attributed to y ions starting at m/z 358.21 (noted y_n) up to m/z 924.5 (y_{n+5}). The last residue of this series with a mass of 128 can be attributed to either K or Q. Nevertheless, the detection of the m/z 84 ion related to the dehydrated immonium ion of K might favour the PFPK sequence than PFPQ. Two other ion

series were related to the b ions due the loss of CO and formation of the corresponding a ions. The two sequences V (L/I)(K/Q) or (L/I)V(K/Q) can be envisaged since two possibilities may be obtained for the b_{n+1} ion at either m/z 441 or 455. The residue detected at a mass difference of 128 Da can be attributed as previously to isobaric K or Q. In the same way, a mass difference of 113 Da corresponds to isomeric L or I. Moreover, the immonium ion of H was detected at m/z 110 so this peptide contained this residue. Taking into account that three other ions at m/z 159, 170 and 187 were assigned as a/b ions and have experienced neutral losses (H_2O , NH_3 noted $^\circ$ and $*$, respectively) are often observed in CID. They can be related to the b_n ion (m/z 342) by the mass difference of H (expected b_{n-1} at m/z 205 and a_{n-1} at m/z 177 but were not detected, but the b_{n-1}° at m/z 187, b_{n-1}^* at m/z 170 and a_{n-1}° at m/z 159 were detected). These result implied that the position of H can be proposed after V or after (L/I) giving the partial sequence HV(L/I)(K/Q) or H (L/I)V(K/Q). Finally, the residual mass corresponding to be the smallest b ion (m/z 205) can be the dipeptide CT or TC. Four high probable sequences can be suggested CTHV (L/I)(K/Q), CTH(L/I)V(K/Q), or TCHV(L/I)(K/Q), and TCH(L/I)V(K/Q). The detection of an internal ion at m/z 237 related to the VH or HV chain could favour the two possibilities CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV(L/I) (K/Q). In conclusion, two putative sequence tags were evidenced with PPFPK and CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV(L/I)(K/Q). These sequences were compared to those found in the NCBI protein database, and showed a partial homology with proteins, with undefined functions, from the plant *Lupinus angustifolius* and the bacterium *Candidatus curtissbacteria*. More information could be deduced from peptide proteolysis prior to MS/MS sequencing to dissociate shorter peptides more amenable to CID fragmentations.

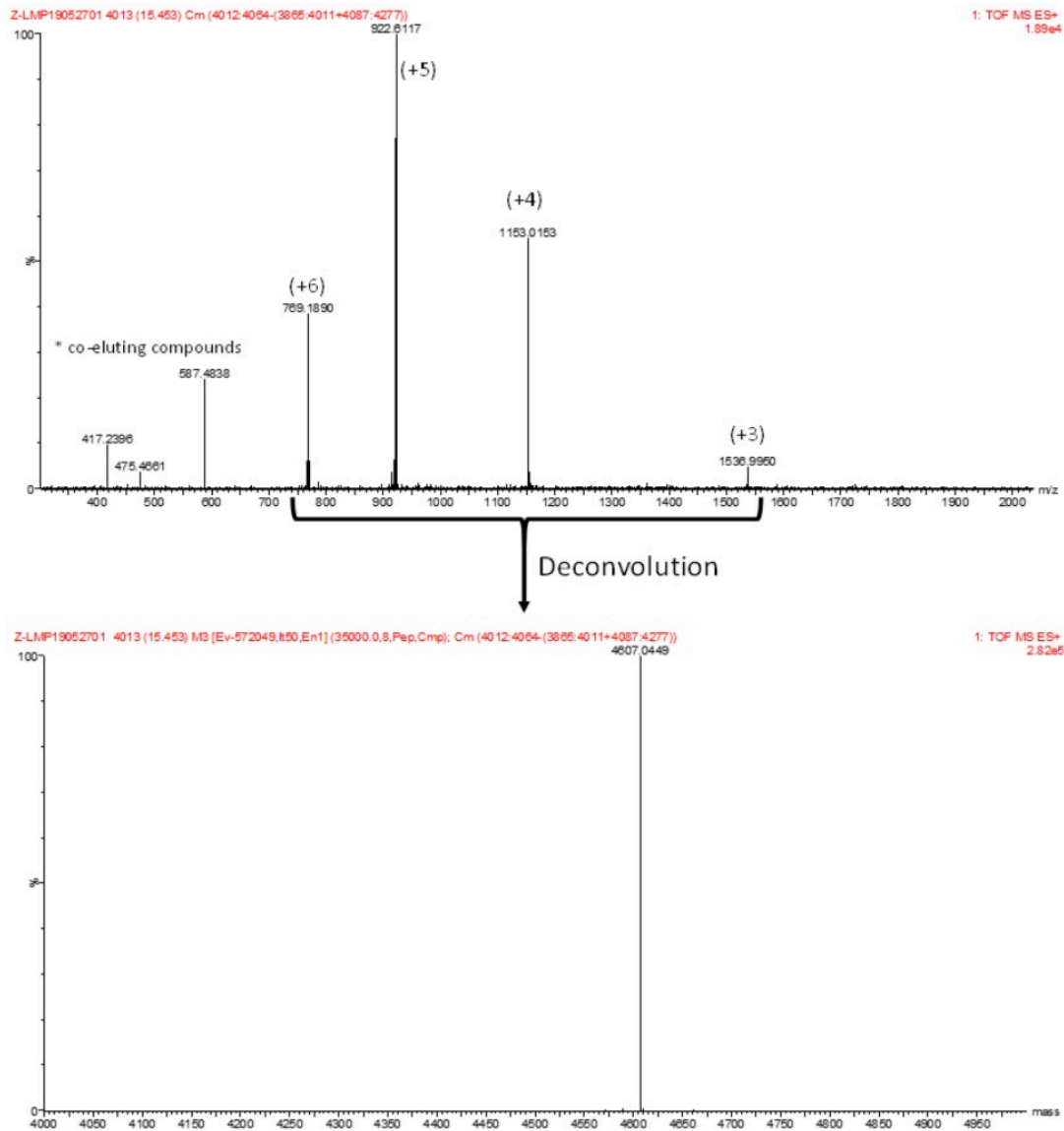


Fig. 6. Mass spectrometry profile of a peptide found in the active proteinaceous sample produced by *T. asahii* ICVY021 and purified using XAD resin.

3.6. TEM

The observation of the control sample by TEM showed the typical shape of the *K. rhizophila* cells, consisting of spherical cells of 1.0–1.5 μm diameter, occurring in pairs, tetrads and packets. When, these cells were treated with the inhibitory compound, oranicin P16 at the $\text{MBC} = 860 \mu\text{g mL}^{-1}$, from *T. asahii* ICVY021, they showed altered walls with apparent stoppage of the cell division process. The cells seem stuck at the same stage with widespread mortality with difficulties to distinguish the plasma membrane compared to the untreated cells (Fig. 8A and B).

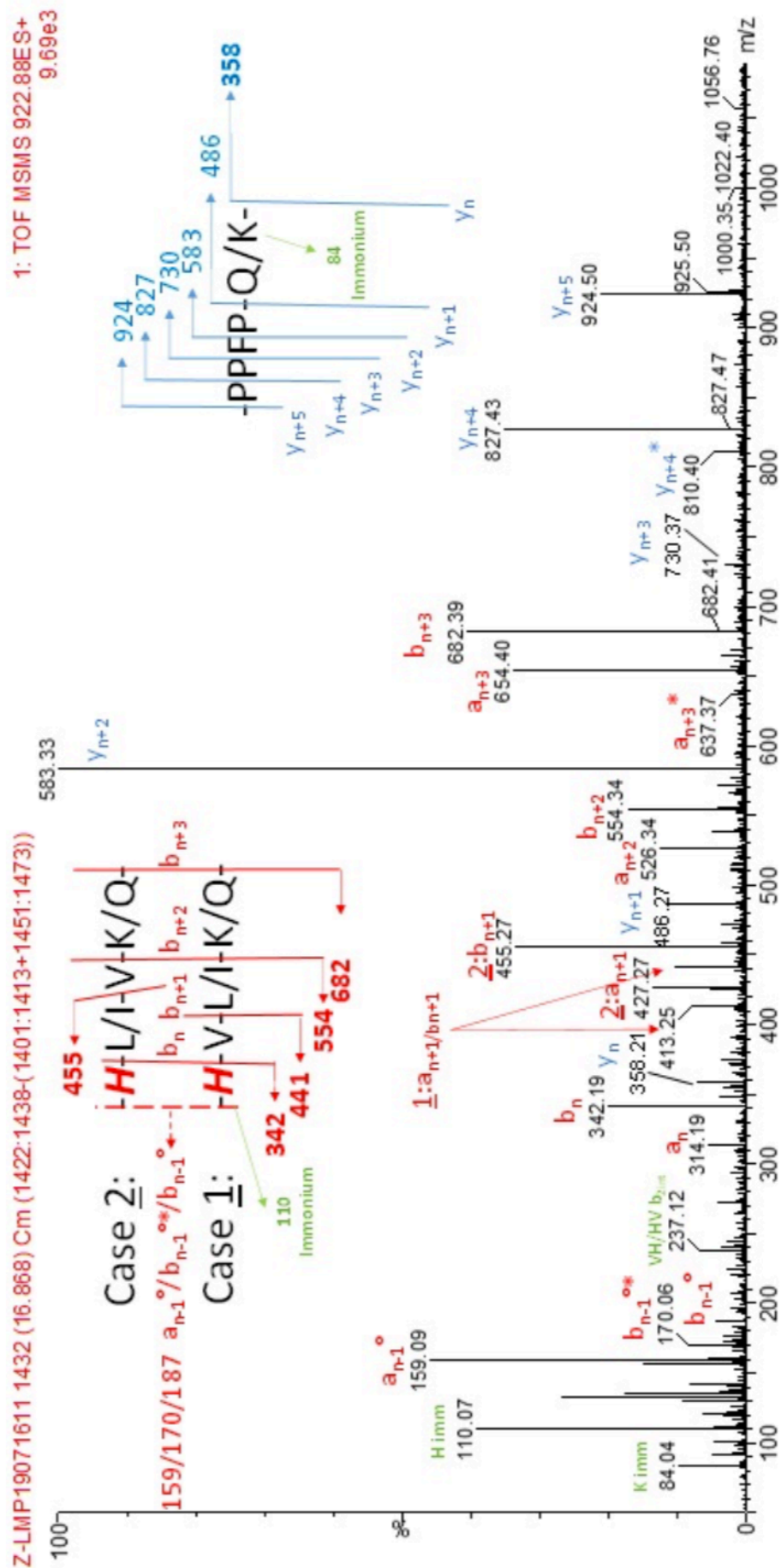


Fig 7. Partial amino-acids sequence of the proteinaceous inhibitory peptide from *T. asahii* ICY021.

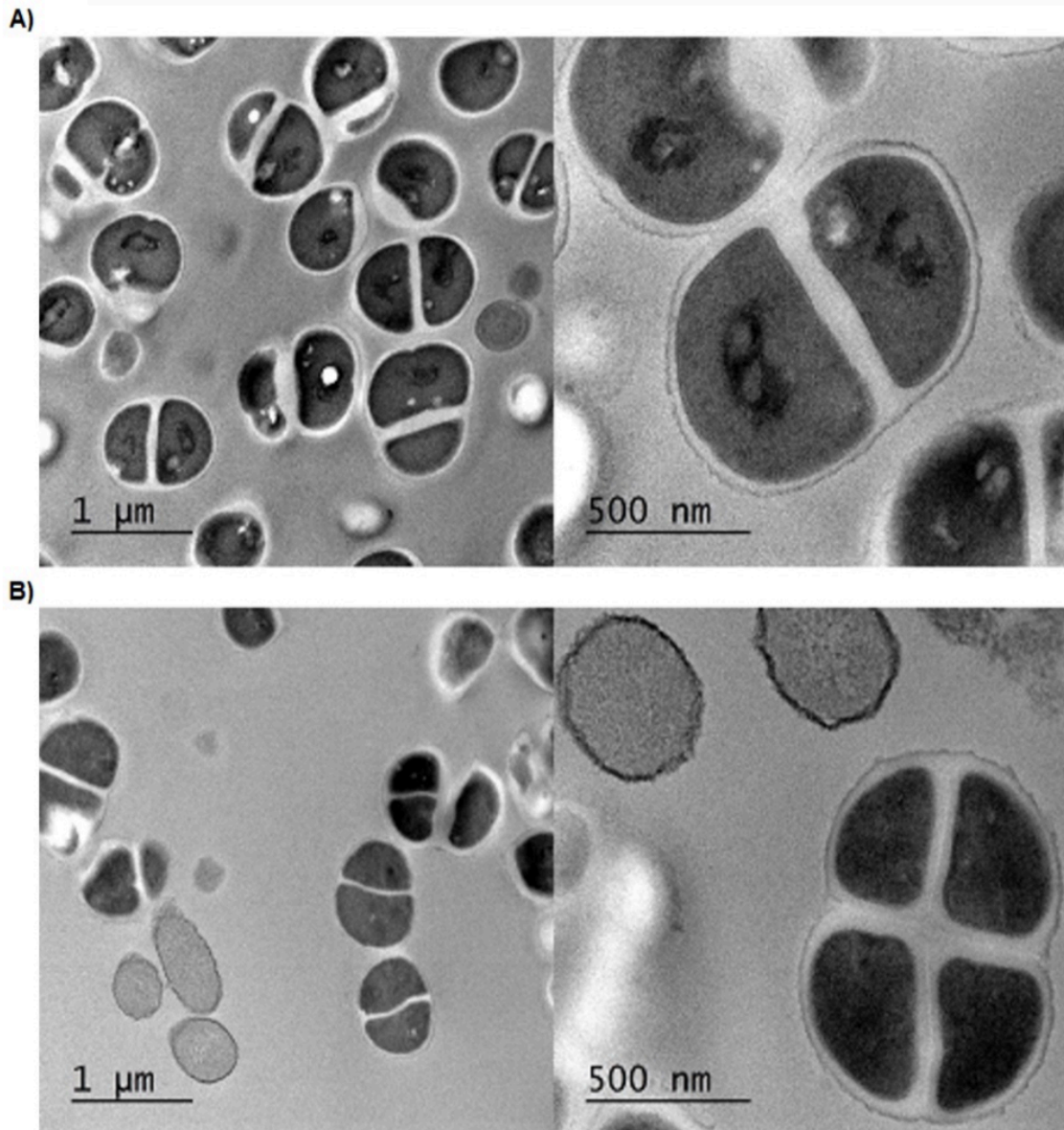


Fig. 8. Transmission electron microscopy (TEM) of *K. rhizophila* CIP 53.45 (A) Untreated control and (B) Treated with the active proteinaceous compound oranicin P16 produced by *T. asahii* ICVY021 and purified using XAD resin.

4. Discussion

The presence of *Trichosporon* spp strains in food and food derivative products was recently reported for French foods (Ceugniez *et al.*, 2017; Garnier *et al.*, 2014), and also in Algerian camel milk (Ider *et al.*, 2019). *T. asahii* strains ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 and ICVY026 from Algerian camel milk (Ider *et al.*, 2019) were studied for their ability to inhibit other microorganisms and characterized for different aspects. No differences were observed in their morphologies aspects following their growth on the YEG agar medium. All the colonies from these different strains were white, dried and wrinkled with irregular margins (Fig. 1). Morphological changes have been reported for clinical strains (Ichikawa,

Yoshiyama, Ohgane, & Ikeda, 2016), but not for food ones. These changes in the morphological aspects can be associated with different factors such as production of β -N-acetylhexosaminidase (Ichikawa *et al.*, 2004), or exposure to oxidants (Zong *et al.*, 2012). Additional studies are necessary to say whether these morphological changes constitute a general metabolic scheme, or are uniquely related to pathogenic phenotypes. The data and statistical analysis enabled us to categorize *T. asahii* strains ICVY021, ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025, and ICVY026 from camel milk origin into two main branches. The first contained only strain ICVY021, and the second contained the other ones (Fig. 2).

T. asahii is an opportunistic basidiomycetous yeast-like anamorphic organism thriving in different ecological niches because of their metabolic adaptation and genome plasticity. The strains from food sources need further assessments to determine their safety and ability to produce antimicrobial substances. These are two important traits that can help promote these strains for industrial applications.

T. asahii ICVY021 produces an antimicrobial peptide, designated oranicin P16, in reference to Oran, an Algerian city, where the strain was isolated and characterized for its antibacterial function. Oranicin P16, of 4607 Da, was produced uniquely after 48 h of growth, and consisted of two sequence tags of PPFPK and CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV (L/I)(K/Q). Moreover, TEM analysis of *K. rhizophila* CIP 53.45 strain treated with oranicin P16 indicated a possible action on its cell-division process. The size, stability to high temperatures or alteration by proteases of oranicin P16 are typical of bacteriocins from Gram-positive and Gram-negative bacteria (Drider & Rebuffat, 2011). *T. asahii* ICVY021 was not hemolytic, and was sensitive to clinical antifungal drugs. Mechanisms by which *Trichosporon* species resist antifungal drugs remain to be better understood, although similarities with *Candida* and *Aspergillus* species were reported (Kushima, Tokimatsu, Ishii, & Kadota, 2015). Moreover, the genes *ERG11* encoding the lanosterol 14- α -demethylase enzyme, which is the primary target of azoles (Kushima *et al.*, 2015), can be lost with a single amino acid substitution (Kushima *et al.*, 2017). *T. asahii* ICVY021 was slightly resistant to 5-fluorocytosine and anidulafungin but this may not be a critical point because the *in vitro* MIC values are not always systematically consistent with the therapeutic doses (Rex & Pfaller, 2002). Therefore, more accurate methods such as the minimum effective concentration (MEC) are needed (Kurtz *et al.*, 1994).

T. asahii ICVY021 was able to adhere to human Caco-2 cells, and this adhesion was reduced by ~90% and almost abolished when pro-teinase and periodic acid, respectively, were

added. These data show the involvement of proteins and polysaccharides at the cell-surface of *T. asahii* ICVY021 in the adhesion to eukaryotic cells.

5. Conclusion

The capability of a non-conventional yeast from camel milk, namely *T. asahii* strain ICVY021 to produce an extracellular antimicrobial peptide of 4607 Da, with two putative sequence tags of PPFPK and CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV(L/I)(K/Q) were studied. This peptide is active only against *K. rhizophila* CIP 53.45 and likely acts as an amitotic peptide. From a biotechnology point of view, the purified peptide, named oranicin P16, may be a valid alternative to antibiotics against *K. rhizophila* human infections or outbreaks of the diseases in rainbow or brown trout. Therefore, the determination of the whole sequence of this antibacterial peptide as well as its expression in heterologous hosts need to be done.

Declaration of competing interest

The authors confirm that they have no conflicts of interest with respect to the work described in this manuscript.

Acknowledgements

SI received a short term Ph.D. grant from the Algerian Government. Experiments done at Lille University were supported by la région des Hauts-de-France through the Contrat-Plan-Etat-Région (CPER) Alibiotech [2016–2020]. The authors would like to thank Dr. Xavier Lepoutre from Hôpital Victor Provo de Roubaix for his kind assistance in assessing the antifungal drugs. Authors would like to thank Anne- Sophie Lacoste and Loïc Brunet of the UMS2014/US41 PLBS-BICeL Campus Cité Scientifique facility for access to instruments and technical advices. The transmission electron microscopy preparations and observations were done on devices acquired through funding from the Agence Nationale de la Recherche ANR 10-EQPX-0004, France.

References

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*, 1219–1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>.
- Ait Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., & Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology*, *68*, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.003>.
- Al-Seraih, A., Belguesmia, Y., Baah, J., Szunerits, S., Boukherroub, R., & Drider, D. (2017). Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: Potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*, 205–219. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0791-5>.
- Al-Seraih, A., Flahaut, C., Krier, F., Cudennec, B., & Drider, D. (2015). Characterization of *Candida famata* isolated from poultry feces for possible probiotic applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *7*, 233–241. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9201-y>.
- Ashengroph, M., & Amini, J. (2017). Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. *Biotechnology*, *7*, 358. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0998-9>.
- Ceugniet, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese "Tomme d'orchies" reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, *52*, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>.
- Ceugniet, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., *et al.* (2017). Fungal diversity of "Tomme d'Orchies" cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *International Journal of Food Microbiology*, *258*, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.015>.
- Chen, P. H., & Chou, J. Y. (2017). Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Polish Journal of Microbiology*, *66*, 101–106. <https://doi.org/10.5604/17331331.1234997>.
- Cho, O., Matsukura, M., & Sugita, T. (2015). Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. *International Journal of Infectious Diseases*, *39*, 87–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.009>.
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2018). *M44 Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts* (3rd ed.). Wayne, PA, USA: CLSI. Internet: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m57-supplement/> (accessed April 21, 2020).
- Colombo, A. L., Padovan, A. C., & Chaves, G. M. (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*, 682–700. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11> submitted for publication.

- Cuenca-Estrella, M., Verweij, P. E., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S., Bille, J., Donnelly, J. P., *et al.* (2012). ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: Diagnostic procedures. *Clinical Microbiology and Infections*, 7, 9–18. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12038>.
- Drider, D., & Rebuffat, S. (2011). *Prokaryotic antimicrobial peptides: From genes to applications*. New York, NY, USA: Springer 978-1-4419-7691-8.
- Elhaj, E., Freigoun Somaya, A. B., & Mohamed, T. T. (2013). Aerobic bacteria and fungi associated with raw camel's milk. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 4, 15–17.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Eucast. Ver 7.3.1. (2017). Internet: https://eucast.org/astoffungi/methodsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_yeasts/(accessed April 21, 2020).
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2014). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, 28(3), E42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042> 5.
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC Biotechnology*, 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-8>.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J. L., Barbier, G., *et al.* (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- Ichikawa, T., Sugita, T., Wang, L., Yokoyama, K., Nishimura, K., & Nishikawa, A. (2004). Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. *Microbiology and Immunology*, 48, 237–242.
- Ichikawa, T., Yoshiyama, N., Ohgane, Y., & Ikeda, R. (2016). Switching of colony morphology and adhesion activity of *Trichosporon asahii* clinical isolates. *Medical Mycology*, 54, 189–196. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv089>.
- Ider, S., Belguesmia, Y., Coucheney, F., Kihal, M., & Drider, D. (2019). Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria. *Archives of Microbiology*, 201, 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01626-y>.
- Kanafani, Z. A., & Perfect, J. J. (2008). Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 120–128.
- Kurtz, M. B., Heath, I. B., Marrinan, J., Dreikorn, S., Onishi, J., & Douglas, C. (1994). Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1480–1489. <https://doi.org/10.1128/aac.38.7.1480>.
- Kushima, H., Tokimatsu, I., Ishii, H., & Kadota, J. (2015). Antifungal susceptibility and drug-resistant mechanism of *Trichosporon*. *Medical Mycology Journal*, 56, 123–128. <https://doi.org/10.3314/mmj.56.J123>.

- Kushima, H., Tokimatsu, I., Ishii, H., Kawano, R., Watanabe, K., & Kadota, J. I. (2017). A new amino acid substitution at G150S in lanosterol 14- α demethylase (Erg11 protein) in multi-azole-resistant *Trichosporon asahii*. *Medical Mycology Journal*, *58*, E23–E28. <https://doi.org/10.3314/mmj.16-00027>.
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2010). Microbiological spoilage of dairy products. In W. H. Sperber, & M. P. Doyle (Eds.). *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety* (pp. 41–67). New York: Springer.
- Mariné, M., Brown, N. A., Riaño-Pachón, D. M., & Goldman, G. H. (2015). On and under the skin: Emerging basidiomycetous yeast infections caused by *Trichosporon* species. *PLoS Pathogens*, *11*, Article e1004982. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004982>.
- Moissenet, D., Becker, K., Mérens, A., Ferroni, A., Dubern, B., & Vu-Thien, H. (2012). Persistent bloodstream infection with *Kocuria rhizophila* related to a damaged central catheter. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*, 1495–1498. <https://doi.org/10.1128/JCM.06038-11>.
- Mouls, L., Aubagnac, J. L., Martinez, J., & Enjalbal, C. (2007). Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-ToF type mass spectrometer. *Journal of Proteome Research*, *6*, 1378–1391. <https://doi.org/10.1021/pr060574o>.
- Ouoba, L., II., Kando, C., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., & Sutherland, J. P. (2012). The microbiology of Bandji, palm wine of *Borassus akeassii* from Burkina Faso: Identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *113*, 1428–1441. <https://doi.org/10.1111/jam.12014>.
- Ouoba, L., II., Nyanga-Koumou, C. G., Parkouda, C., Sawadogo, H., Kobawila, S. C., Keleke, S., *et al.* (2010). Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *Journal of Applied Microbiology*, *108*, 2019–2029. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04603.x>.
- Paserakung, A., Pattarajinda, V., Vichitphan, K., & Froetschel, M. A. (2015). Selection and identification of oleaginous yeast isolated from soil, animal feed and ruminal fluid for use as feed supplement in dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*, *61*, 325–332. <https://doi.org/10.1111/lam.12475>.
- Pękala, A., Paździor, E., Antychowicz, J., Bernad, A., Głowacka, H., Więcek, B., *et al.* (2018). *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*, *486*, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.028>.
- Pukančíková, L., Lipničanová, S., Kačániová, M., Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2016). Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. *Nova Biotechnologica et Chimica*, *15*(2), 142–155. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0015>.
- Rai, A. K., Kumari, R., Sanjukta, S., & Sahoo, D. (2016). Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresource Technology*, *219*, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.129>.

- Rex, J. H., & Pfaller, M. A. (2002). Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clinical Infectious Diseases*, 35, 982–989. <https://doi.org/10.1086/342384>.
- Singh, Y., & Gupta, R. (2016). Novel S-enantioselective lipase TALipB from *Trichosporon asahii* MSR54: Heterologous expression, characterization, conformational stability and homology modeling. *Enzyme and Microbial Technology*, 83, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.11.003>.
- Takarada, H., Sekine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., *et al.* (2008). Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *Journal of Bacteriology*, 190, 4139–4146. <https://doi.org/10.1128/JB.01853-07>.
- Valle, R. S., Ramos, L. S., Reis, V. J., Ziccardi, M., Dornelas-Ribeiro, M., Sodr e, C. L., *et al.* (2017). *Trichosporon asahii* secretes a 30-kDa aspartic peptidase. *Microbiology Research*, 205, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.015>.
- Zhang, Y., Li, H., Yang, R., & Wang, C. (2016). Study on antioxidant enzymatic activities of *Trichosporon asahii*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 56, 445–450. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0593-5>.
- Zhang, E., Sugita, T., Tsuboi, R., Yamazaki, T., & Makimura, K. (2011). The opportunistic yeast pathogen *Trichosporon asahii* colonizes the skin of healthy individuals: Analysis of 380 healthy individuals by age and gender using a nested polymerase chain reaction assay. *Microbiology and Immunology*, 55, 483–488. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00341.x>.
- Živković, M., Čadež, N., Uroić, K., Miljković, M., Tolinački, M., Doušova, P., *et al.* (2015). Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4, 12–18. <https://doi.org/10.5455/jice.20141128051842>.
- Zong, L., Li, H., Yang, R., Zhu, H., Wang, C., & Ao, J. (2012). Growth of *Trichosporon asahii* in presence of the oxidants, hydrogen peroxide, diamide and menadione. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 7147–7155. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.164>.

Autres résultats

*Identification des levures par SM/MALDI-TOF, et la
recherche de leurs propriétés technologiques*

1. Identification des souches par la spectrométrie de masse MALDI-TOF

1.1.Méthodologie

10 souches ont été utilisées pour réaliser une identification protéomique des levures dans les espèces sont déjà identifiées par les méthodes biochimiques et moléculaires. Pour cela nous avons utilisé le spectrométrie de masse MALDI-TOF de marque MALDI Biotyper (BrukerDaltonik, Germany). Nous avons préparé les cellules levuriennes en suivant les recommandations de Kolečka *et al.* (2013), les cultures de levures doivent être fraîches et jeunes (environ 20 heures) sur le milieu extrait de levure – peptone – glucose (YPG) Agar. Pour la méthode de l'identification, nous avons suivi le protocole de Zhao *et al.* (2018) (Fig. 16).

La méthode utilisée est celle de transfert direct étendu, pour chaque levure, une seule colonie a été choisie pour étaler des cellules isolées, par un cure-dent formant un film mince sur trois spots individuels de la plaque MALDI-TOF en acier poli MSP96 (Bruker Daltonik, Germany). Chaque frottis cellulaire a été ensuite recouvert par 1 µl d'acide formique à 70% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), après un séchage à l'air. Chaque spot a été ensuite recouvert par 1 µl de matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) saturé [10 mg / ml d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) (Bruker Daltonik, Germany) dans 50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich)], puis séchée à l'air. La plaque MALDI-TOF a été analysée par le système TOF / TOF autoflex speed TOF / TOF (Bruker Daltonik) et le logiciel Bruker Daltonik MALDI Biotyper en utilisant le standard de test bactérien IVD (BTS) (Bruker Daltonik) comme contrôle.

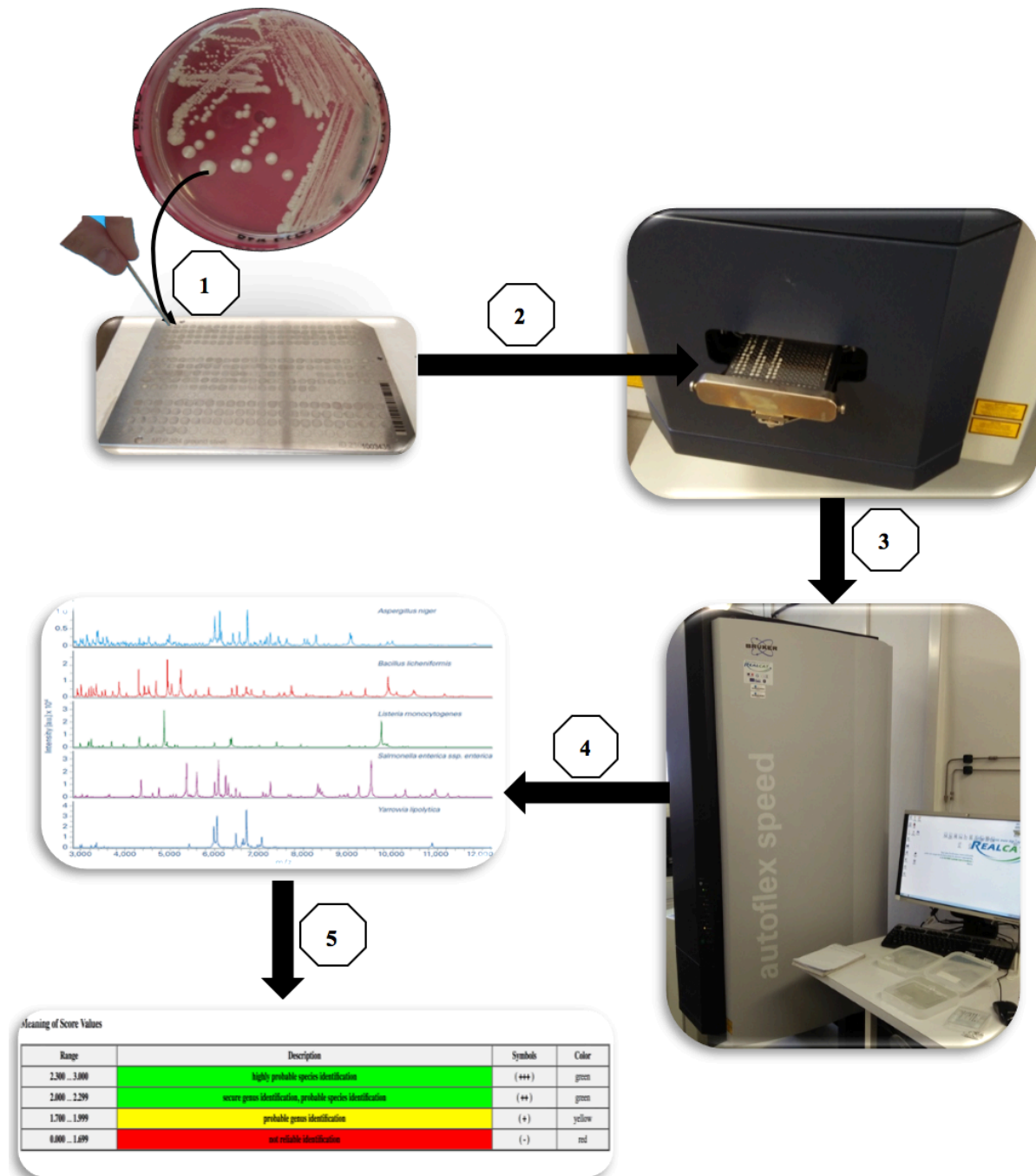


Figure 11 : schéma récapitulatif des étapes de l'identification des levures par la technique de la spectrométrie de masse de type Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF).

- (1) : étalement des cellules de levures sur la plaque MALDI-TOF ;
- (2) : introduction de la plaque dans le MALDI Biotyper (BrukerDaltonik, Germany) ;
- (3) : bombardage du mélange échantillon/matrice co-cristallisé par un faisceau laser, permettant ainsi l'ionisation et la désorption des molécules du mélange. Les molécules ionisées passent alors dans un tube de vol et sont séparées selon leur ratio masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF). Les ions arrivent sur un détecteur qui amplifie le signal. (4) : traduction du résultat sous forme d'un spectre de masse ;
- (5) : génération d'un score pour le classement des résultats. Un score entre 2,33 et 3 est considéré comme une très probable identification d'espèce, entre 2 et 2,32 comme une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce, entre 1,7 et 1,999 comme une probable identification de genre et <1,7 identification non fiable (Zhao et al. 2018).

1.2. Résultats et discussions

Nous présenterons ici les résultats obtenus lors de l'indentification de dix souches de levures pures par la méthode MS / MALDI-TOF, ces résultats nous permettent de faire une comparaison entre l'indentification obtenue par les méthodes moléculaires et l'identification protéomique, visant à identifier l'ensemble des protéines intra-cellulaires des levures.

Bien que, l'application de cette méthode d'identification des levures soit récente par rapport aux bactéries (Fastner *et al.* 2001) ou aux parasites (Papadopoulos *et al.* 2004), est que sa banque de données de référence est en cours d'amélioration (Desoubieux *et al.* 2010). Les résultats de notre étude montrent l'excellente concordance entre les deux démarches, où 9 souches sur 10 souches testées ont été correctement identifiées à l'échelle de l'espèce (Tab. 5).

Le score d'identification pour certaines souches était faible, tel que celui pour les souches P21, B6, BSK2 (F1), G30 et SA2 (5), cependant les espèces correspondantes à ces scores étaient les mêmes que celles obtenues par l'identification réalisée avec la séquence de la région 26S rDNA sur la base de données NCBI. Sauf pour la souche G8, qui a été identifiée comme *Pichia galeiformis* par 26S rDNA, alors que par MALDI-TOF, elle l'a été en tant que *Kluyveromyces aestuarii*. Toutefois ces deux espèces appartiennent au même ordre des *Sccharomycetales* dans la taxonomie des levures.

Tableau 6 : Résultats d'identification des souches de levures avec le MS/MALDI-TOF, couleur verte : excellente identification à l'ordre d'espèce ; en jaune : excellente à l'ordre du genre ; rouge : identification non fiable.

Code de la souche	Identification avec la région 26S rDNA	Identification avec MS / MALDI-TOF	Scor d'identification	Identifiant de l'NCBI
ICVY021	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Trichosporon asahii</i>	2,14	82508
P21	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	1,17	5480
G10	<i>Pichia manshurica</i>	<i>Pichia manshurica</i>	2,12	121235
SA2 (5)	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>	1,41	36911
B6	<i>Rhodotorula musilaginosa</i>	<i>Rhodotorula musilaginosa</i>	1,89	5537
BSK2 (F1)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,96	4911
SA2 (11)	<i>Candida zeylanoides</i>	Aucun pic trouvé	< 0	-
G8	<i>Pichia galeiformis</i>	<i>Kluyveromyces aestuarii</i>	1,72	33165
G30	<i>Millerozyma farinosa</i>	<i>Millerozyma farinosa</i>	1,53	4920
D1 (3)	<i>Pichia fermentans</i>	<i>Pichia fermentans</i>	2,07	53655

Dans notre étude le MALDI-TOF a échoué dans l'identification d'une seule souche « SA2 (11) », ou nous n'avons pas eu de spectres d'identification. Alors qu'il a donné une excellente identification de trois souches « D1(3), G10 et ICVY021 ». La souche ICVY021, qui correspond à *T. asahii*, a été identifiée sans difficulté par les quatre méthodes d'identifications utilisées dans cette étude « API 20C AUX, ITS1-5,8s-ITS2, 26S rDNA et MS / MALDI-TOF ». Par contre, selon Zhao *et al.* (2018), peut être identifiée par erreur comme étant une *Candida tropicalis*, même après plusieurs tentatives.

Toutes les souches de notre étude ont été identifiées dès la première tentative, sans avoir recouru à une extraction des protéines intracellulaire ou même un deuxième cycle d'extraction, qui est souvent nécessaire lors de l'identification des espèces de *C. tropicalis*, *C. kefyr* et *C. parapsilosis*. Pour cette dernière espèce, il faut cependant noter l'aptitude de la SM à classer correctement trois souches de collection correspondant aux génotypes *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.* 2005).

2. Activités technologiques des levures dominantes

2.1.Méthodologie

a. La thermotolérance et la thermorésistance

Selon Arthur et Watson (1976) la thermotolérance des levures a été examinée par l'incubation de ces dernières dans les températures suivantes « 4, 15, 37 et 45 °C », l'ensemencement se fait sur la gélose YEPG, et après 48h d'incubation observe la croissance des colonies des levures.

Afin de déterminer les levures qui résistent à des températures élevées. Des tubes contenant de culture liquide de chaque souche ont été incubés dans le bain marin à une température de 60°C pendant 10 min, la lecture des résultats se fait par mesure de la densité optique des cultures à $t = 0$, puis à $t = 10$ min (Put *et al.* 1976).

b. Pouvoir fermentaire du lait de chamelle cru

La capacité des levures à fermenter le lait, a été effectuée sur le lait de chamelle pasteurisé et exercé à une tyndallisation au laboratoire pour éliminer le maximum toute sorte de microorganismes. Chaque tube à essai contenant 9 ml du lait de chamelle a étéensemencé avec un inoculum pur de 1 ml de levures calibrée à une $DO_{580\text{ nm}} = 0,5$, correspondant à une concentration cellulaire moyenne de 10^6 cellules ml^{-1} . La fermentation du lait se fait à 30°C pendant 72h. la lecture des résultats se fait par l'observation de l'aspect, le pH et/ou l'acidité, voire l'odeur du lait, puis comparer avec le tube contrôle sans inoculum.

➤ Mesure de pH et acidité dornic après fermentation

Après la fermentation du lait de chamelle, le pH de chaque tube a été mesuré à l'aide du pH-mètre à électrode. De même pour l'acidité dornic (D°), elle a été mesurée selon méthode de IRAM 14005 (Fabro *et al.* 2006). Avec une légère modification comme suivant : On a rajouté 3 gouttes de solution de phénolphaléine (préparée à 1% dans de l'éthanol à 96%) à 10 ml d'échantillon. Le mélange a été titré avec du NaOH d'une normalité $N = 0,1$, jusqu'à ce que le premier changement de couleur (en rose) persiste pendant 30 s. Une goutte supplémentaire de NaOH a été ajoutée et le volume final de NaOH ajouté a été noté.

Les résultats sont exprimé en degré dornic où $1^{\circ}\text{D} = 0,1\text{g/l}$ d'acide lactique et le calcul du degré d'acidité est comme suivant :

c. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est critère très important dans la caractérisation des candidats microbien d'intérêt technologique, principalement dans la fabrication des produits laitiers. Pour cela la capacité protéolytique de nos souches a été analyse sur le milieu YEPG additionné à 1% de poudre de lait écrémé, un ensemencement par spot de 10 μl a été effectué pour chaque souche à partir d'une culture liquide de 24h. l'activité protéolytique de chaque souche a été estimée après l'incubation des boites de pétris à 30 ° C pendant 48 h, en mesurant le diamètre de la zone claire entourant le spot inoculées (mm) (Gardini *et al.* 2006).

d. Activité lipolytique

Afin de déterminer l'activité lipolytique des levures, une pré-culture de chaque souche dans YEPG liquide a été initialement cultivée à 30 ° C pendant 24 h. 10 μl de ces cultures ont été inoculées par spot sur la gélose à Tween 80 selon la méthode décrite par Cardoso *et al.* (2015). Avec des modifications dans la composition du milieu et la température d'incubation. Après 48h d'incubation à 30°C, l'activité lipolytique de chaque souche a été estimée, en mesurant le diamètre de la zone opaque, dû à l'hydrolyse du Tween 80 qui interagis avec le CaCl_2 présent dans le milieu, entourant le spot inoculées (mm).

e. Activité antioxydante

L'activité antioxydante du lactosérum lait chamelle après sa fermentation avec des levures a été évaluée à l'aide la méthode de l'activité de balayage des radicaux de diphényl-picrylhydrazyle (DPPH) décrite par Soleymanzadeh *et al.* (2016).

Tout d'abord on a fermenté le lait de chamelle avec les souches de levures, comme décrit au-dessus, puis la fraction du lactosérum a été séparé en ajustant le pH à 4,6, par le HCL à 1 mol/L, et par cntrifugation à 20 000 x g pendant 20 min, le surnageant a été filtré par des filtres milipors 45 μm .

Puis, on a préparé une solution de radicaux DPPH (0,002%, p / v) dans de l'éthanol à 95% selon Molyneux (2004). Un volume de 1800 μl de cette solution a été ajouté à 200 μL de la

$$[\text{D}^{\circ} = V_{(\text{NaOH utilisé pour neutraliser l'acide lactique de l'échantillon})} \times 10]$$

fraction de lactosérum, bien vortexée et incubée pendant 30 min dans une pièce sombre à température ambiante. L'absorbance de chaque échantillon à 517 nm a été mesurée à l'aide du

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Absorbance \text{ à } 517_{\text{blanc}} - Absorbance \text{ à } 517_{\text{échantillon}}) / Absorbance \text{ à } 517_{\text{blanc}}] \times 100\%$$

spectrophotomètre Uv-Visible (Jenway 7315). L'éthanol a été utilisé comme blanc, tandis que la solution de DPPH dans l'éthanol a servi de témoin. L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage de l'activité DPPH calculée comme suivant :

2.2. Résultats et discussions

a. La thermotolérance et la thermorésistance

La majorité de nos souches ont exprimées un intervalle de thermotolérance mésophile, ce qui est naturel pour toutes les levures (Kurtzman *et al.* 2011). La température de 37°C est la température du corps humain, c'est pour cela que la capacité de croissance d'une souche à cette température peut être un avantage si elle est dotée de propriétés probiotiques ou un inconvénient si elle est pathogène.

Selon, Yamina *et al.* (2013), qui ont isolés des BL thermophiles du lait cru de chamelle Algérienne, la température de 45°C peut permettre de déterminer les microorganismes qui sont thermophiles, et ainsi donner un indice de l'origine animale de la souche. Dans notre étude quatre espèces ont été capables de croître à 45°C, *Millerozyma farinosa*, *C. tartarivorans*, *C. zeylanoides*, *K. marxianus*, de plus ces espèces ont été aussi capable de résister à une température de 60°C pendant 10 min. Toutes les souches que nous avons isolées sont inactives à basses températures (Tab. 7).

a. Pouvoir fermentaire du lait cru de chamelle

Le test de lactofermentation et de coagulation du lait a le mérite d'évaluer globalement la qualité microbienne fromagère du lait. Il est basé sur la coagulation acide du lait par floculation des protéines. Ce test permet en effet de juger le comportement d'un microorganisme, des levures dans nos cas, dans l'écosystème du lait dans des conditions données et d'observer l'effet de la croissance tel que la variation du pH (Bérodier et Spinnler 2011).

Tableau 7 : caractéristiques technologiques des levures isolées du lait de chamelle

L'espèce de la souche	Thermotolérance				Thermorésistance A 60°C pendant 10min	Pouvoir fermentaire du lait de chamelle	pH du lait fermenté après 72h	Degré d'ornic (D°) du lait fermenté après 72h	Protéolyse (mm)	Lipolyse (mm)	L'activité antioxydante du lactosérum (% Inhibition du DPPH)
	5°C	15°C	37°C	45°C							
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	+	-	-	R	4,67 ± 0,17	41,5 ± 0,7	0	12 ± 11,31	23,27 ± 5,27
<i>P. fermentans</i>	-	+	+	-	+	R	5,88 ± 1,08	23,66 ± 14,15	0	0	27,79 ± 9,15
<i>Milleroxyma farinosa</i>	-	+	+	+	-	L	6,57 ± 0,31	19 ± 8,66	9 ± 3	0	35,32 ± 10,87
<i>P. galeiformis</i>	-	+	+	+	-	R	4,75 ± 0,1	42 ± 1,41	10,5 ± 2,12	0	24,56 ± 1,68
<i>Clavispora lusitaniae</i>	-	+	+	-	-	L	5,45 ± 0,3	23,5 ± 3,53	20 ± ND	10 ± ND	21,7 ± 5,09
<i>Rh. musilaginosa</i>	-	+	-	-	-	M	6,24 ± 0,55	22,5 ± 0,7	20 ± ND	7 ± ND	16,11 ± 13,03
<i>P. manshurica</i>	-	+	+	-	-	R	4,63 ± ND	39 ± ND	10 ± ND	0	20,6 ± ND
<i>C. tartarivorans</i>	-	+	+	+	+	R	4,93 ± ND	35 ± ND	0	0	16,04 ± ND
<i>C. zeylanoides</i>	-	+	+	+	+	R	5,1 ± ND	39 ± ND	5 ± ND	0	37,26 ± ND
<i>K. marxianus</i>	-	+	+	+	+	M	6,2 ± ND	23 ± ND	0	0	32,23 ± ND
<i>C. maris</i>	-	+	+	-	-	R	5,38 ± ND	33 ± ND	0	0	18,3 ± ND
<i>T. asahii</i>	-	+	+	-	-	P	6,55 ± ND	16 ± ND	0	0	15,7 ± ND

R : fermentation rapide, après 24h ; M : fermentation moyenne, après 48h ; L : fermentation lente, après 72h ; P : pas de fermentation ; + : croissance de colonie ; - : pas de croissance ; ± : écartype ; ND : pas de valeurs.

91% des espèces de levures, dans notre étude ont pu fermenter le lait cru de chamelle, avec une rapidité variable selon chaque espèce (Tab. 6). Parmi ce groupe, 63% des espèces ont fermentées le lait au bout de 24h d'incubation, alors que les 37% restantes nécessitaient plus de temps, 48 h à 72 h, pour fermenter le lait complètement. De plus l'aspect macroscopique du lait fermenté variait selon la souche inoculée, ainsi on observe des souches qui donnent un aspect gonflé, d'autres donnent un aspect floconneux et d'autres encore donnent un aspect digéré (Fig. 19).

Cela provoque par la suite une acidification du lait fermenté, très clairement mis en évidence dans nos résultats, où toutes les mesures de pH ont révélé une diminution remarquable de ce dernier, atteignant jusqu'à 4,6, sachant qu'à ce pH tout le lactosérum se sépare du caillé.

La diminution du pH est souvent en corrélation avec l'augmentation du degré dornic, qui résulte de la libération de l'acide lactique, présent essentiellement sous forme de lactate. La valeur la plus élevée du degré dornic relevé était de 42 D°, ce qui correspond à 4,2g/l d'acide lactique dans le lait de chamelle fermenté.

Bien que la diminution du pH et la libération de l'acide lactique soient liés à la capacité de la souche à dégrader le lactose, on peut observer que le pH du lait fermenté avec la levure *K. marxianus* n'a pas diminué (pH= 6,2). Ceci malgré que cette espèce soit connue pour son pouvoir à assimiler le lactose. Cela peut être expliqué par le phénomène de désacidification, qui est aussi connu chez *K. marxianus*, qui consiste à la consommation du lactate, présent dans le milieu, contribuant ainsi à la remontée du pH. Cela a un rôle important dans l'installation et le développement des bactéries acido-sensibles (Lenoir *et al.* 1985), et contribue à l'amélioration des produits fermentés tels que le Gariss (Abdelgadir *et al.* 2008), et le Shubat (Rahman *et al.* 2009). De même le phénomène de désacidification, peut être aussi attribué à la dégradation des acides aminés libérant ainsi des métabolites alcalins tel que l'ammoniac (Mounier *et coll.*, 2008).

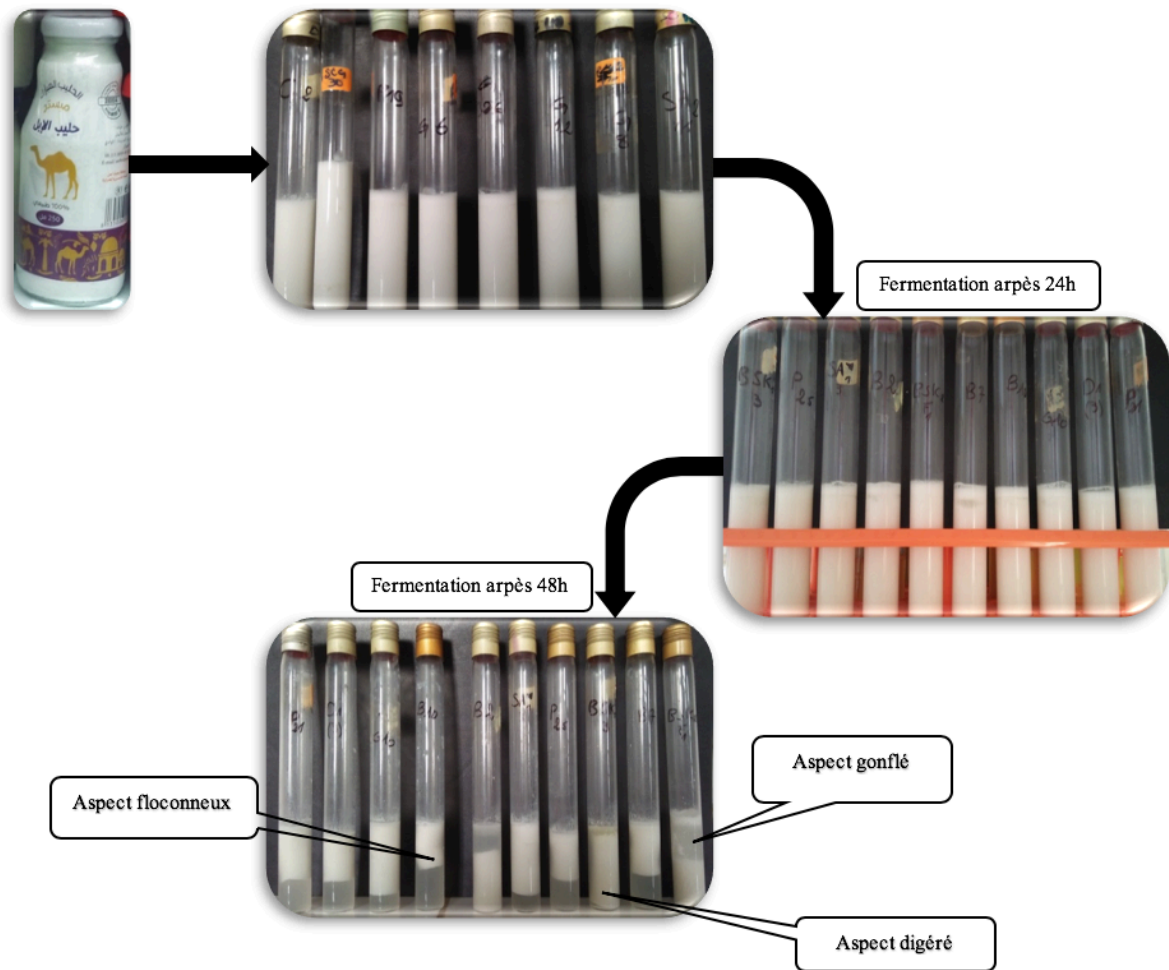


Figure 12 : résultats des aspects du lait de chamelle fermenté avec les souches pures de levures

b. Criblage de l'activité lytique extracellulaire des souches de levures

Au cours de la fabrication des produits laitiers fermentés et l'affinage des fromages, diverses transformations biochimiques se produisent. Les caséines sont dégradées par protéolyse primaire en peptides, puis par protéolyse secondaire en acides aminés. La matière grasse en acides gras par lipolyse, des citrates et des lactates par la fermentation. Le produit va ainsi « mûrir » et acquérir ses caractéristiques organoleptiques (Laithier 2012).

Plusieurs études signalent que les levures sont fortement impliquées dans ces mécanismes de transformation (Cardoso *et al.* 2015; Boutrou et Guéguen 2005; Roostita et Fleet 1996; Suzzi *et al.* 2001; Ferreira et Viljoen 2003). De même notre étude rapporte des résultats satisfaisants de criblage préliminaire des levures protéolytiques et lipolytiques (Tab. 7).

Les espèces de notre étude ont été plus protéolytiques que lipolytiques, car six espèces « *Millerozyma farinosa*, *P. galeiformis*, *Clavispora lusitaniae*, *Rh. musilaginosa*, *P. manshurica* et *C. zeylanoides* », étaient protéolytiques, tandis que seule trois espèces étaient lipolytiques « *C. parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae* et *Rh. musilaginosa* ».

Les activités protéolytiques les plus importantes parmi nos souches ont été retrouvées chez *Clavispora lusitaniae* et *Rh. musilaginosa* avec un halo de lyse de 20 mm. Ce résultat est très proche de celui de Binetti *et al.* (2013), qui ont rapporté qu'une souche de *Clavispora lusitaniae* isolée du lait, avait la plus forte activité protéolytique parmi leurs isolats. Cependant, des souches de *Rh. musilaginosa* protéolytiques ont été isolées à partir d'autres écosystèmes que le lait, tels que les saucisses fermentées (Tamang et Fleet 2009) et les écosystèmes marins (Chaud *et al.* 2016).

De plus, notre étude est la seule qui a démontré le caractère protéolytique de *Millerozyma farinosa*, *P. galeiformis* et *P. manshurica* associées au lait de chamelle.

La lipolyse ou la production d'enzymes de type lipase est bien connue chez la levure *Yarrowia lipolytica*. C'est pour cette raison que sa présence, en concentrations élevées, est très importante lors de la fabrication de divers fromages, où son action commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Mansour 2009). Loin du secteur agro-alimentaire, *Yarrowia lipolytica* peut même utiliser les hydrocarbures comme seules sources de carbone et d'énergie (Fickers *et al.* 2005). Toutefois, nos résultats ont révélé que *C. parapsilosis* est l'espèce lipolytique la plus active (Tab. 7). Mais cette espèce est souvent considérée comme une levure pathogène (Develoux et Bretagne 2005). C'est pour cela que son

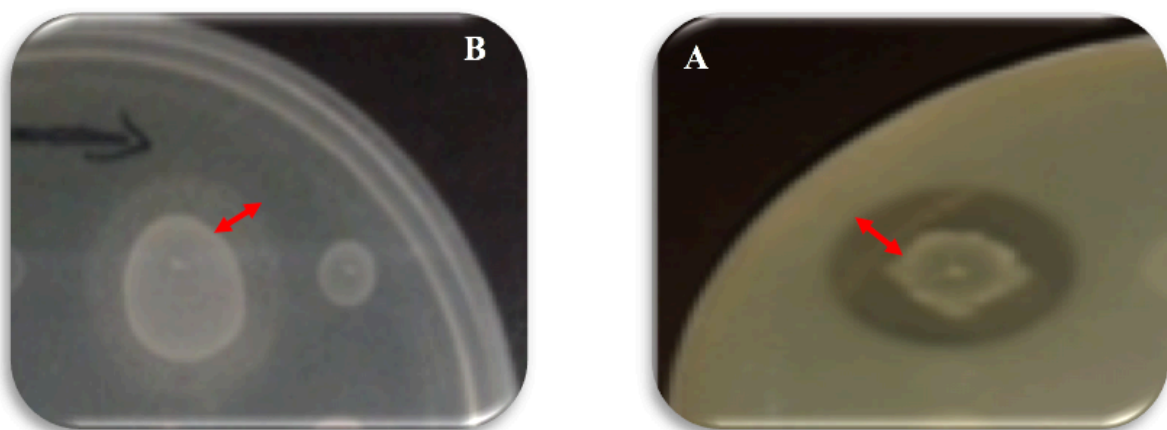


Figure 13 : Images représentent l'action des enzymes lytiques extracellulaires des souches de levures ; (A) : ➔ montre le halo clair des protéases sur le milieu lait écrémé à 1% ; (B) : ➔ montre le halo opaque due à la dégradation du Tween80 par les lipases.

utilisation dans la transformation des produits laitiers, ou même d'autres aliments concentrés en lipides, n'est pas conseillée.

c. L'activité antioxydante de la fraction du lactosérum

Dans ce test nous avons posé l'hypothèse que le lait, et principalement le lait de chamelle fermenté, peut être un réservoir important de peptides bioactifs. Plusieurs études ont été menées dans ce sens, mais la plupart d'entre elles ont effectué ce type d'étude sur le lait de chamelle fermenté avec des BL (Shori 2013; Soleymanzadeh *et al.* 2016). Or l'impact des levures sur ce type de substrat est encore méconnu.

La plus grande proportion des protéines du lait se retrouve dans la fraction caséique, représentant entre 61,8 et 88,5% des protéines totales, alors que les protéines du lactosérum en constituent 20 à 25% (Ereifej *et al.* 2011). Ces dernières possèdent la plus haute qualité nutritionnelle de toutes les protéines alimentaires, et sont une source optimale d'ingrédients alimentaires fonctionnels (Dullius *et al.* 2018).

Dans notre étude, l'activité antioxydante de la fraction de lactosérum du lait de chamelle pasteurisé puis fermenté avec des souches pures de levures, est exprimée en pourcentage d'inhibition ou de piégeage des radicaux DPPH (Tab. 7). La plus faible activité d'inhibition était de 15,7 % dans l'échantillon du lait fermenté avec *T. asahii*, tandis que l'activité la plus élevée était de 37,26% dans l'échantillon du lait fermenté avec *C. zeylanoides*, suivi par le lait fermenté avec *Millerozyma farinosa*, avec un pourcentage d'inhibition de 35,32%. Nos résultats sont proches de ceux de Al-Saleh *et al.* (2014), qui ont trouvé que les pourcentages d'inhibitions des échantillons de caséine du lait de chamelle variaient de 27,05% à 36,82% après 30 minutes d'incubation.

Cependant, Soleymanzadeh *et al.* (2016) ont remarqué que le lactosérum du lait de chamelle fermenté par *Leu. lactis*, a montré une activité de piégeage des radicaux DPPH plus élevée ($57,90 \pm 4,59 \mu\text{M}$) qui est l'équivalent d'environ 62% d'inhibition selon Molyneux (2004). Parrella *et al.* (2012) rajoutent que la co-incubation des bactéries lactiques avec la levure probiotique *S. boulardii* augmente l'activité antioxydante du lait fermenté avec des BL seules. Ainsi que, l'ajout de soja dans les yaourts au lait de chamelle améliore la viabilité des BL et l'activité antioxydante pendant le stockage réfrigéré (Shori 2013).

Il faut signaler que les deux espèces *C. zeylanoides* et *Millerozyma farinosa* de notre étude avaient une activité protéolytique non négligeable, alors que *T. asahii* n'était pas protéolytique (Tab. 6). Ainsi la protéolyse semble avoir un effet sur l'augmentation de l'activité antioxydante, soit due à l'hydrolysate du lactosérum ou à l'hydrolysate des caséines. Ce qui a été confirmé par Al-Saleh *et al.* (2014), qui ont noté que l'activité antioxydante est nettement améliorée avec l'augmentation du degré d'hydrolyse de la caséine. Cumby *et al.* (2008) ont attribué cette amélioration à l'apparition de groupements fonctionnels d'hydrolysate de protéines, tels que les résidus d'acides aminés piégeant les radicaux libres (par exemple, tryptophane, tyrosine, phénylalanine, cystéine ou méthionine) (Ries 2009).

Discussion générale

Tous les microorganismes peuvent coloniser le lait, car c'est un milieu riche en nutriments nécessaires à leur développement, tandis que plusieurs facteurs influencent la qualité et la quantité de ces microorganismes.

Quantitativement, dans notre étude, nous avons trouvé que le nombre moyen de la microflore levurienne du lait de chamelle cru algérien a été estimé à $3,55 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. De même, Elhassan *et al.* (2013) ont rapporté une valeur proche, avec une flore fongique estimée à $1,69 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ dans un autre échantillon du lait de chamelle algérien. Néanmoins, d'autres études ont signalé que les levures peuvent atteindre des concentrations plus élevées, allant jusqu'à $3,8 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (Benkerroum *et al.*, 2003), et 10^5 UFC.mL⁻¹ (Njage *et al.*, 2011) respectivement dans le lait de chamelle marocain et le lait de chamelle du Kenya.

Qualitativement, les levures ont dominé le microbiote fongique de 11 échantillons de lait de chamelle que nous avons examinés. En fait, après le processus de traite, nous n'avons détecté que $0,38 \pm 0,06 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹, ce qui représente un niveau de comptage très faible. Cette concentration délimite un faible indice de contamination expliqué par différents facteurs dont les règles de propreté et d'hygiène appliquées pendant la traite et le type d'élevage semi-extensif utilisé par les éleveurs. Ce qui réduirait le risque de la contamination du lait de chamelle par des microbes pathogènes, principalement des levures, qui sont souvent impliquées dans le développement des mammites fongique bovine (Saragosse *et al.* 2011; Ksouri *et al.* 2015) et non cameline. Selon différents auteurs, les cas de mammite de chameau causée par des champignons ne représenteraient que 4% du nombre de ces infections et étaient principalement dues à *C. albicans* (El-Jakee 1998; Pal 2015).

Nous avons observé une augmentation importante de la charge des levures après la collecte du lait cru de chamelle, de l'ordre de $3,98 \pm 0,02 \times 10^2$ UFC mL⁻¹, après (3 h), puis $6,3 \pm 0,01 \times 10^2$ UFC mL⁻¹, après (8 h) de la traite. Ces données sont en bon accord avec celles précédemment rapportées par Njage *et al.* (2011).

La teneur en levure est fortement influencée par les conditions de transport et la température de stockage, qui peuvent aussi induire le développement d'autres levures de contaminations qui proviennent des dispositifs utilisés (Callon *et al.* 2007). Cela peut ainsi avoir un impact sur la diversité des levures dans le lait de chamelle.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'effet saisonnier, sur cette diversité, des différents échantillons prélevés des régions (arides ou semi-arides). Pour cela nous avons identifié les espèces de 51 isolats de levures, en utilisant les API 20C AUX, pour la caractérisation phénotypique initiale. Afin de regrouper les espèces qui seront identifiées

complètement par deux méthodes robustes, qui sont le séquençage de leurs régions d'ADNr 26S et ITS1-5.8S-ITS2 (Ceugniz *et al.* 2015). Ces méthodes nous ont permis de former un contingent basé sur 7 genres et 12 espèces constituant les souches de levures algériennes issues du lait de chamelle. A partir de ce contingent nous avons choisis 10 espèces pour réaliser une étude comparative entre l'identification moléculaire et l'identification protéomique en utilisant SM/MALDI-TOF.

Les résultats de cette comparaison montrent une excellente concordance entre les deux démarches d'identification, où 9 souches sur 10 souches testés ont identifié au niveau de l'espèce. Ce résultat, est considérablement proche de celui de Arastehfar *et al.* (2019) et Zhao *et al.* (2018) à l'exception notable de l'origine clinique des isolats de levures considérés.

Parmi les 12 espèces retrouvées, les espèces dominantes étaient *T. asahii* (23%), *P. fermentans* (19%) et *R. mucilaginosa* (14%). À notre connaissance, il s'agit de la première étude révélant la présence de l'espèce *T. asahii* dans le lait de chamelle cru. Cela peut être un avantage pour la fabrication des fromages à base du lait de chamelle, car Bockelmann *et al.* (2008), ont considéré cette espèce comme un contaminant communément trouvé dans le processus de production de fromage. Suzzi *et al.* (2003) ont mis en évidence les fortes activités protéolytiques et lipolytiques de cette espèce et son influence sur la maturation et la caractérisation du goût de certains fromages. De plus, *T. asahii* semble être naturellement présent dans les fromages et autres produits fermentés (Suzzi *et al.* 2003; Vasdinyei et Deak 2003; Jespersen *et al.* 2005; Schwan *et al.* 2007).

De même pour l'espèce *P. fermentans*, dont la forme anamorphique est *C. lambica*, notre étude est la première à signaler la présence de cette espèce dans le lait cru de chamelle. De plus elle est en général absente dans les produits issus du lait de chamelle (Abdelgadir *et al.* 2008; Watanabe *et al.* 2008; Lore *et al.* 2005; Rahman *et al.* 2009; Njage *et al.* 2011). En revanche, *P. fermentans* est relativement commune dans le lait cru de vache (Lavoie *et al.* 2012; Delavenne *et al.* 2011; Chen *et al.* 2010b), et aussi présente dans le camembert produit à partir du lait de vache (De Freitas *et al.* 2008). Selon Mu *et al.* (2012), cette espèce a un rôle dans la formation d'arômes dans mes produits laitiers tels que le Koumiss. Ces saveurs sont attribuées aux esters et à la formation d'alcools de saveurs (De Freitas *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012).

Les 38% d'isolats restants comprenaient 9 espèces dont la plupart ont été isolés pour la première fois à partir de lait cru de chamelle. Ces espèces sont *M. farinosa* (8%), *P. galeiformis* (6%), *C. tartarivorans* (4%) et *P. manshurica* (2%). A noter que ces espèces ont été identifiées au niveau moléculaire mais pas par les bandes API 20C AUX, à cause des limites d'identification avec les bases de données API.

Plusieurs facteurs peuvent influencer le profil de la microflore indigène du lait cru, et la saisonnalité peut en être un (O'Sullivan et Cotter 2017; Callon *et al.* 2007). Ici, l'identification réalisée sur des levures isolées en octobre et mars, nous a permis d'aborder le contenu des levures et de mettre en lumière l'impact de la saisonnalité sur cette diversité.

Nous avons noté que la teneur en levures a atteint son maximum, dans la région des hautes plateaux semi-arides, au cours de la saison d'automne, et une diminution non significative ($P > 0,05$) au printemps. Alors que, dans la région aride du Sahara, la différence de charge de levure entre les deux saisons était significative ($P < 0,05$), avec plus de levures dans le lait de chamelle collecté pendant l'automne. Les données issues de cette étude, liées à l'impact saisonnier, sont en bon accord avec celles rapportées par Callon *et al.* (2007) sur le lait de chèvre.

La grande majorité des espèces, avec 11 espèces, ont été identifiées pendant l'automne. A l'inverse du printemps où seules 6 espèces ont été rencontrées. Cependant, les espèces *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* et *C. zeylanoides* ont été retrouvés au cours des deux saisons.

La présence de ces levures peut être liée aux facteurs environnementaux et à la méthode d'élevage des chameaux, qui sont les principales sources de la population microbienne de lait cru (Vacheyrou *et al.* 2011). Sinon, la présence d'autres espèces nouvellement identifiées dans le lait de chamelle telles que *M. farinosa*, *P. galeiformis*, *C. tartarivorans* et *P. manshurica* semble être influencée par le climat.

Après avoir réalisé plusieurs tests technologiques, tels que la fermentation du lait de chamelle, la protéolyse, la lipolyse, l'activité antioxydante et l'activité antagoniste. Nous sommes arrivés à caractériser une activité antagoniste intéressante de la souche *T. asahii*, que l'on associe avec le code ICVY021. L'importance de cette activité est qu'elle est due à la production d'une molécule antimicrobienne extracellulaire de nature protéique par une levure non conventionnelle, active contre *K. rhizophila* CIP 53.45. De plus c'est la première fois qu'on met en évidence de tels résultats pour l'espèce *T. asahii*. Nous avons appelé ce peptide antimicrobien, P16 ou oranicine, en référence à la ville d'Oran (Algérie) où la souche a été caractérisée.

T. asahii ICVY021 produit ce peptide qu'après 48 h de croissance. Selon les analyses effectuées par LC-MS/MS ce peptide antimicrobien a un poids moléculaire de 4 607 Da, il comprend deux marqueurs de séquence putatives PPFPK et CTHV (L / I) (K / Q) ou TCHV (L / I) (K / Q).

De même, Naimah *et al.* (2018) ont caractérisé un peptide antibactérien, en utilisant une technique d'électrophorèse avec du SDS-PAGE, produit par *S. cerevisiae* de poids moléculaire de 5 792 daltons.

Des tentatives pour associer les séquences putatives du peptide antimicrobien P16/Oranicine à des fonctions connues ont été effectuées sur la base de données de protéines NCBI à l'aide du logiciel en ligne BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ces séquences correspondent en partie aux séquences de protéines inconnues plus grandes provenant de la plante *Lupinus angustifolius* et de la bactérie *Candidatus curtissbacteria*. Cette question nécessitera avant d'être résolue de plus amples investigations sur la séquence de P16 /Oranicine.

De plus, après l'analyse par MET, effectuée sur *K. rhizophila* CIP 53.45 traitée avec la P16 / Oranicine, il apparaît que son action pourrait influencer sur la division cellulaire. Il faut signaler que, la taille du peptide antimicrobien P16 / oranicine, sa stabilité à des températures élevées et sa sensibilité aux actions des protéases correspondent aux caractéristiques habituellement rapportées pour les bactériocines, qui sont des peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Dridier et Rebuffat, 2011).

De plus, la molécule P16 / Oranicine, peut exercer son action inhibitrice de *K. rhizophila* CIP 53.45 dans le lait écrémé, à la CMI qui a été définie à 215 µg. mL⁻¹. Dans ce contexte le composé inhibiteur purifié de *T. asahii* ICVY021 réduit le nombre de cellules de *K. rhizophila* CIP 53.45, exprimé en UFC.mL⁻¹, de 6,38 à 5,79 Log. Hatoum *et al.* (2013) ont isolé des levures du lait cru et du fromage dans la région de la province de Québec, productrices de composés antilisteriaux, qui semble être de nature protéique et qui peuvent réduire le nombre de *Listeria monocytogenes* viables jusqu'à quatre logs en une heure.

Nous avons par ailleurs établi la parenté génétique de *T. asahii* ICVY021 antagoniste, avec les autres *T. asahii* ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 et ICVY026 non antagonistes, en utilisant l'approche rep-PCR. L'analyse des données et leur étude statistique ont permis de classer ces six souches de *T. asahii*, issues du lait de chamelle, en deux branches principales. La première composée des souches ICVY022, ICVY023, ICVY024, ICVY025 et ICVY026, et la seconde ne contient que la souche ICVY021. Surtout, la souche antagoniste de *T. asahii* ICVY021 présentait un motif d'ADN différent des autres sur la base de l'analyse rep-PCR. Néanmoins, à ce stade, il est difficile de lier le modèle d'ADN à ses propriétés inhibitrices.

En revanche, le potentiel pathogène de *T. asahii* ICVY021 a été établi. *T. asahii* ICVY021 ne présente pas d'activité hémolytique et sensible à la plupart des antifongiques

cliniques utilisés dans cette étude. Pour vérifier cette sensibilité, les valeurs de CMI ont été interprétées en utilisant les points critiques décrits par Kanafani et Perfect (2008) pour les souches de *T. asahii*, et ceux approuvés par le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST) et le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) en utilisant *Candida albicans* comme souche de référence (Cuenca-Estrella *et al.*, 2012).

En combinant ces deux méthodes indépendantes, *T. asahii* ICVY021 est sensible à l'amphotéricine B, au voriconazole et aux azoles mais pas à la 5-fluorocytosine et à l'anidulafungine. Les mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques chez les espèces de *Trichosporon* restent à déterminer, bien que des similitudes avec des agents pathogènes tels que certaines *Candida* et *Aspergillus* puissent exister selon Kushima *et al.* (2015). Ces auteurs ont rapporté le lanostérol 14- α -déméthylase (Erg11p), codé par le gène *ERG11* codant pour chez *T. asahii* était la cible principale des azoles (Kushima *et al.*, 2015), et qu'une seule substitution d'acides aminés dans modifie l'affinité de cette enzyme pour les azoles (Kushima *et al.*, 2017).

Toujours au sujet de la pathogénicité, *T. asahii* ICVY021 n'était pas cytotoxique pour les cellules tumorales colorectales humaines (Caco-2) après 24 h de contact, au contraire de Seddik *et al.* (2016) qui ont identifié des levures antagonistes vis-à-vis *E. coli* et *S. aureus*, mais ces levures avaient un effet cytotoxique pour les Caco-2.

Selon Havenaar *et al.* (1992), l'action antagoniste d'une souche augmente si elle peut adhérer aux cellules épithéliales. Ce qui le cas pour *T. asahii* ICVY021 qui adhère fortement aux cellules Caco-2 humaines. Cette adhérence a pu être réduite d'environ 90% et presque supprimée lorsque cette souche a été traitée avec de la protéinase et de l'acide périodique, respectivement. Ces données démontrent l'implication des protéines et principalement des polysaccharides dans le processus d'adhésion de *T. asahii* ICVY021 aux cellules eucaryotes.

Conclusion et perspectives

Cette étude traite d'un sujet important dans les technologies microbiennes. En complément à de nombreux travaux qui ont étudiés les propriétés technologiques des bactéries lactiques issues du lait de chamelle, ce travail permet d'enrichir les connaissances sur le microbiote du lait de chamelle, en étudiant la diversité des levures présentes dans cet environnement ainsi que leurs propriétés technologiques et probiotiques. Sachant que les levures issues de ce biotope ne sont pas explorées et très peu étudiées.

Dans ce contexte, notre étude apporte des informations pertinentes, et nous permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

Le lait cru de chamelle d'origine Algérienne, contient une diversité typique de levures. Après l'analyse de plusieurs échantillons de ce type de lait, provenant de différentes régions à différentes périodes, nous sommes arrivés à isoler un contingent important d'espèces de levures, dont 12 espèces appartenant à 7 genres différents. D'après les données bibliographiques aucune étude précédente, portant sur la diversité des levures du lait de chamelle cru, n'a pu identifier les espèces suivantes : *Trichosporon asahii*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia galeiformis*, *Candida tartarivorans*, *Pichia manshurica* et *Pichia fermentans*. Les espèces dominantes dans notre étude étaient *T. asahii* (23%), *P. fermentans* (19%) et *Rhodotorula mucilaginosa* (14%).

L'effet saisonnier influence considérablement la charge et la diversité de cette population levurienne. En l'occurrence la charge la plus élevée et la plus grande diversité ont été enregistrées dans des échantillons prélevés pendant la saison d'automne, dans les régions des hautes plateaux semi-arides et arides avec $0,66 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ et $0,51 \times 10^3$ UFC mL⁻¹, respectivement. On notera que *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans*, *C. parapsilosis* et *C. zeylanoides* ont été détectés au printemps et en automne.

La protéomique peut être un outil intéressant et rapide pour l'identification des levures isolées des substrats alimentaire, tel que le lait et ces dérivés.

Au sujet des propriétés technologique des levures nos souches, celles-ci ont montré une activité protéolytique et antioxydante acceptable. Les souches les plus actives étaient *C. zeylanoides* et *Millerozyma farinosa*, sachant que l'implication de cette dernière dans le domaine agro-alimentaire est peu connue.

L'étude du pouvoir antagoniste des souches de levures que nous avons identifiées, nous a amené à retrouver cette capacité seulement chez la souche de *Trichosporon asahii* ICVY021, vis-à-vis de la bactérie cible *Kocuria rhizophila* CIP 53.45. Cette activité était due à la production d'un peptide antibactérien, qu'on a dénommé P16 / Oranicine. Ce peptide s'est avéré être stable à la chaleur, et son analyse par LC-MS/MS a permis de retrouver les séquences partielles d'acides aminés PPFPK et CTHV (L / I) (K / Q) ou TCHV (L / I) (K / Q). L'analyse en microscopie des effets de ce peptide purifié sur la bactérie cible nous a amené à supposer qu'il agirait sur le mécanisme de division cellulaire.

T. asahii ou le peptide antibactérien qu'elle produit pourraient être considérés pour une utilisation comme additifs alimentaire, car leur activité anti-*K. rhizophila* a été confirmée, *in situ*, en utilisant du lait comme matrice alimentaire. De plus, *T. asahii* ICVY021 n'a pas montré d'activité hémolytique ni aucun effet de cytotoxicité contre les cellules eucaryotes Caco-2. Enfin, *T. asahii* ICVY021 était sensible à la majorité des composés antifongiques testés.

À notre connaissance, notre étude est la seule jusqu'à présent qui a permis d'isoler une souche de *T. asahii* d'origine alimentaire capable de sécréter un peptide antibactérien avec un spectre d'activité très étroit.

Les résultats obtenus durant ces travaux de thèse nécessitent d'être approfondis afin d'améliorer nos connaissances et de combler les questions encore en suspens. C'est dans cette optique qu'il est envisagé en perspectives de cette étude les travaux d'habilitation suivants ;

- La première priorité, est la bonne compréhension du mécanisme d'action du peptide antibactérien que nous avons identifié. De plus, nous essayerons d'augmenter son spectre d'action par l'étude de son effet synergique avec d'autres molécules antimicrobiennes.
- Développer nos connaissances au sujet du pouvoir antioxydant de nos levures, sachant que d'après la littérature, les levures peuvent être des agents antioxydants puissants via la production de molécules antioxydantes tel que le glutathion.
- Puisque la quasi-totalité de nos souches fermentent le lait cru de chamelle, cela nous amène à considérer l'étude de la libération des peptides bioactifs issus de cette fermentation telle que l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1.

Références bibliographiques

- Abarenkov, Kessy., R. Henrik Nilsson., Karl-Henrik Larsson., Ian J. Alexander., Ursula Eberhardt., Susanne Erland., Klaus Høiland., Rasmus Kjølner., Ellen Larsson., Taina Pennanen., Robin Sen., Andy F. S. Taylor., Leho Tedersoo., Björn M. Ursing., Trude Vrålstad., Kare Liimatainen., Ursula Peintner. et Urmas Kõljalg. 2010. 'The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives', *New Phytologist*, 186: 281-85.
- Abdelgadir, Warda., Dennis S Nielsen., Siddig Hamad. et Mogens Jakobsen. 2008. 'A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*', *International journal of food microbiology*, 127: 215-19.
- Abdurahman, Omar Abdulkadir Sh. 2004. *Milk and meat from the camel: handbook on products and processing* (vdf Hochschulverlag AG)
- Adams, M. R.. et C. J. Hall. 1988. 'Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures', *International Journal of Food Science & Technology*, 23: 287-92.
- Agheysi, R 2008. 'The probiotics market: Ingredients, supplements, foods', BCC Research.
- Al-Saleh, Abdulrahman A., Ali A. M. Metwalli., Elsayed A. Ismail. et Omar A. Alhaj. 2014. 'Antioxidative activity of camel milk casein hydrolysates', *Journal of Camel Practice and Research*, 21: 229-37.
- Al-Seraih, Alaa., Christophe Flahaut., François Krier., Benoit Cudennec. et Djamel Drider. 2015. 'Characterization of *Candida famata* Isolated from Poultry Feces for Possible Probiotic Applications', *Probiotics and antimicrobial proteins*, 7: 233-41.
- Aldridge, Susan., John Parascandola. et Jeffrey Louis Sturchio. 1999. *The discovery and development of penicillin 1928-1945: the Alexander Fleming Laboratory Museum, London, UK, November 19, 1999: an International Historic Chemical Landmark* (American Chemical Society)
- Aloun, Lynda. et Basma Hamadache. 2019. 'L'influence de la variation des paramètres techniques et des ferments lactiques sur la qualité du fromage type «Camembert»', Université de Bouira.
- Anand, Santosh., Kumar Siddharth Singh. et Dipesh Aggarwal. 2018. 'Expanding Avenues for Probiotic Yeast: *Saccharomyces boulardii*.' in, *Microbial Cell Factories* (CRC Press), pp. 125-47.
- Anas, Mami., Henni Jamal Eddine. et Kihal Mebrouk. 2008. 'Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*', *World J Dairy Food Sci*, 3: 39-49.
- Arastehfar, Amir., Farnaz Daneshnia., Mohammad Kord., Maryam Roudbary., Hossein Zarrinfar., Wenjie Fang., Sayed Jamal Hashemi., Mohammad Javad Najafzadeh., Sadegh Khodavaisy. et Weihua Pan. 2019. 'Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA sequencing for a wide range of clinically isolated yeast species: Improved identification by combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an alternative strategy for developing countries', *Frontiers in cellular infection microbiology*, 9: 21.
- Arevalo-Villena, M., A Briones-Perez., MR Corbo., M Sinigaglia. et A Bevilacqua. 2017. 'Biotechnological application of yeasts in food science: starter cultures, probiotics and enzyme production', *Journal of applied microbiology*, 123: 1360-72.
- Arthur, HELEN. et KENNETH Watson. 1976. 'Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts', *Journal of Bacteriology*, 128: 56-68.

- Babelhadj, B., A Adamou., C Thorin., F Tekkouk-Zemmouchi., A Benaïssa. et C Guintard. 2016. 'Étude ostéo-biométrique comparée des «races» camelines algériennes Sahraoui et Targui (*Camelus dromedarius* L., 1758)', *Rev. Méd. Vét.*, 167: 77-92.
- Bachmann, Werner. 1934. 'Experimenteller Beitrag zur Anaeroben Oberflächenkultur', *Klinische Wochenschrift*, 13: 810-11.
- Baillargeon, Mary Welch. et Stephen G McCarthy. 1991. '*Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: Purification, characterization and fatty acid specificity', *Lipids*, 26: 831-36.
- Barbosa, Teresa M., Cláudia R Serra., Roberto M La Ragione., Martin J Woodward. et Adriano O Henriques. 2005. 'Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract', *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 968-78.
- Barnett, James Arthur., Roger William Payne. et David Yarrow. 1990. *Yeasts: characteristics and identification* (Cambridge University Press (CUP) Cambridge).1012
- Beg, Q., M Kapoor., L Mahajan. et GS Hoondal. 2001. 'Microbial xylanases and their industrial applications: a review', *Applied microbiology biotechnology*, 56: 326-38.
- Begerow, Dominik., Henrik Nilsson., Martin Unterseher. et Wolfgang Maier. 2010. 'Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures', *Applied microbiology biotechnology*, 87: 99-108.
- Bellil, Yahia., Zineb Benmechernene., Wassila Chahrour Bellil. et Mebrouk Kihal. 2018. 'Antibacterial and antibiofilm activity of the bacteriocin-producing strain *Leuconostoc mesenteroides* CHBY46 isolated from Algerian dromedary milk against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms', *South Asian Journal of Experimental Biology*, 8: 120-31.
- Bénarouche, Anaïs., Vanessa Point., Frédéric Carrière. et Jean-François Cavalier. 2014. 'An interfacial and comparative *in vitro* study of gastrointestinal lipases and *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase, a candidate for enzyme replacement therapy', *Biochimie*, 102: 145-53.
- Benhoua, Insaf Samira., Arnaud Heumann., Aurélie Rieu., Jean Guzzo., Mabrouk Kihal., Guessas Bettache., Dominique Champion., Christian Coelho. et Stephanie Weidmann. 2019. 'Exopolysaccharide produced by *Weissella confusa*: Chemical characterisation, rheology and bioactivity', *International Dairy Journal*, 90: 88-94.
- Benkerroum, Noreddine. 2010. 'Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review', *International journal of dairy technology*, 63: 320-38.
- Benmechernene, Zineb., Hanane Fatma Chentouf., Bellil Yahia., Ghazi Fatima., Marcos Quintela-Baluja., Pilar Calo-Mata. et Jorge Barros-Velázquez. 2013. 'Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk', *BioMed research international*, 2013: 14.
- Berbee, Mary L. et John W Taylor. 1992. 'Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence', *Molecular Biology Evolution*, 9: 278-84.
- Bérodier, A. et HE Spinnler, Laithier C 2011. "Microflore du lait et caractéristiques sensorielles des fromages, p 29–39." In *CNAOL*. Paris, France.
- Bevan, EA 1963. 'The physiological basis of the killer character in yeast', *Proc. 11th Int. Cong. Gene*, 1: 202-03.
- Bilinski, CA., G Innamorato. et GG Stewart. 1985. 'Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera', *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1330-32.
- Binetti, A., M Carrasco., J Reinheimer. et V Suárez. 2013. 'Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties', *Journal of applied microbiology*, 115: 434-44.
- Blackwell, Meredith., Rytas Vilgalys., Timothy Y James. et John W Taylor. 2012. 'Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc', *The Tree of Life Web Project*.

- Blanco, Pilar., Carmen Sieiro. et Tomás G Villa. 1999. 'Production of pectic enzymes in yeasts', *FEMS Microbiology Letters*, 175: 1-9.
- Boekhout, Teun. et Cletus P Kurtzman. 1996. 'Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera.' in, *Nonconventional yeasts in biotechnology* (Springer), pp. 1-81.
- Bonatsou, S., A Benítez., F Rodríguez-Gómez., Efstathios Z Panagou. et Francisco Noé Arroyo-López. 2015. 'Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing', *Food microbiology*, 46: 66-73.
- Bonekamp, Fons J. et Johannes Oosterom. 1994. 'On the safety of *Kluyveromyces lactis*—a review', *Applied microbiology biotechnology*, 41: 1-3.
- Bostian, Keith A., James E Hopper., David T Rogers. et Donald J Tipper. 1980. 'Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin', *Cell*, 19: 403-14.
- Bostian, Keith A., Joyce A Sturgeon. et Donald J Tipper. 1980. 'Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L', *Journal of Bacteriology*, 143: 463-70.
- Bourgeois, CM., JF Mescle. et J Zucca. 1996. *Microbiologie alimentaire: tome 1-Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. tome 2-Aliments fermentés et fermentations alimentaires* (Tec & Doc Lavoisier).672
- Boutrou, Rachel. et Micheline Guéguen. 2005. 'Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology', *International journal of food microbiology*, 102: 1-20.
- Bradshaw, Jeremy P. 2003. 'Cationic antimicrobial peptides', *BioDrugs*, 17: 233-40.
- Branco, Patrícia., Diana Francisco., Christophe Chambon., Michel Hébraud., Nils Arneborg., Maria Gabriela Almeida., Jorge Caldeira. et Helena Albergaria. 2014. 'Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions', *Applied microbiology biotechnology*, 98: 843-53.
- Branco, Patrícia., Tiago Viana., Helena Albergaria. et Nils Arneborg. 2015. 'Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells', *International journal of food microbiology*, 205: 112-18.
- Bryskier, A. 2005. 'Peptide antibiotics.' in, *In Antimicrobial Agents* (American Society of Microbiology), pp. 826-79.
- Büchl, NR. et H Seiler. 2011. 'Yeast and Molds/Yeasts in Milk and Dairy Products.' in, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Elsevier: London), pp. 744-53.
- Buerth, Christoph., Denis Tielker. et Joachim F Ernst. 2016. '*Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications', *Applied microbiology biotechnology*, 100: 6981-90.
- Bussey, Howard., Oren Steinmetz. et Donna Saville. 1983. 'Protein secretion in yeast: two chromosomal mutants that oversecrete killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*', *Current genetics*, 7: 449-56.
- Buyuksirit, T. et H Kuleasan. 2014. 'Antimicrobial agents produced by yeasts', *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food Biotechnological Engineering*, 8: 1096-99.
- Buzzini, Pietro. et Ann Vaughan-Martini. 2006. 'Yeast biodiversity and biotechnology.' in, *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (Springer), pp. 533-59.
- Callon, Cécile., Frédérique Duthoit., Céline Delbès., Marion Ferrand., Yves Le Frileux., Renée De Crémoux. et Marie-Christine Montel. 2007. 'Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches', *Systematic applied microbiology*, 30: 547-60.

- Capita, Rosa. et Carlos Alonso-Calleja. 2013. 'Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry', *Critical reviews in food science nutrition*, 53: 11-48.
- Cardoso, Valéria M., Beatriz M Borelli., Carla A Lara., Marco A Soares., Carla Pataro., Emerson C Bodevan. et Carlos A Rosa. 2015. 'The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese', *Food Research International*, 69: 331-40.
- Cascales, Eric., Susan K Buchanan., Denis Duché., Colin Kleanthous., Roland Lloubes., Kathleen Postle., Margaret Riley., Stephen Slatin. et Daniele Cavard. 2007. 'Colicin biology', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 158-229.
- Cavalero, David A. et David G Cooper. 2003. 'The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214', *Journal of biotechnology*, 103: 31-41.
- Charteris, William P., Phillip M Kelly., Lorenzo Morelli. et J Kevin Collins. 1997. 'Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in mixed bacterial populations', *International journal of food microbiology*, 35: 1-27.
- Chaud, Luciana CS., Luciana D Lario., Rafaella C Bonugli-Santos., Lara D Sette., Adalberto Pessoa Junior. et Maria das Graças de A Felipe. 2016. 'Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7', *New biotechnology*, 33: 807-14.
- Chaves-López, Clemencia., Annalisa Serio., Maria Martuscelli., Antonello Paparella., Esteban Osorio-Cadavid. et Giovanna Suzzi. 2011. 'Microbiological characteristics of kumis, a traditional fermented Colombian milk, with particular emphasis on enterococci population', *Food microbiology*, 28: 1041-47.
- Chaves-López, Clemencia., Rosanna Tofalo., Annalisa Serio., Antonello Paparella., Giampiero Sacchetti. et Giovanna Suzzi. 2012. 'Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk', *International journal of food microbiology*, 159: 39-46.
- Chehma, A. 2004. 'Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie', *Lait de chamelle pour l'Afrique*. FAO.org: 43.
- Chen, Y., Z Wang., X Chen., Y Liu., H Zhang. et T Sun. 2010. 'Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from koumiss, a traditional fermented mare's milk', *Journal of dairy science*, 93: 884-92.
- Choudhary, Devendra K. et Bhavdish N Johri. 2009. 'Basidiomycetous yeasts: current status.' in, *Yeast biotechnology: diversity and applications* (Springer), pp. 19-46.
- Cleveland, Jennifer., Thomas J Montville., Ingolf F Nes. et Michael L Chikindas. 2001. 'Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation', *International journal of food microbiology*, 71: 1-20.
- Cockrill, W Ross. 1985. *The camelid: an all-purpose animal. Vol. 2, Bibliography* (Nordiska Afrikainstitutet).229
- Collins, JK., G Thornton. et GO Sullivan. 1998. 'Selection of probiotic strains for human applications', *International Dairy Journal*, 8: 487-90.
- Cook, Michael T., George Tzortzis., Dimitris Charalampopoulos. et Vitaliy V Khutoryanskiy. 2012. 'Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery', *Journal of controlled release*, 162: 56-67.
- Cormier, Monique Catherine. et Aline Francoeur. 2005. *Les dictionnaires Larousse: genèse et évolution* (PUM)
- Cumby, Nichole., Ying Zhong., Marian Naczka. et Fereidoon Shahidi. 2008. 'Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates', *Food chemistry*, 109: 144-48.

- Cutting, Simon M. 2011. 'Bacillus probiotics', *Food microbiology*, 28: 214-20.
- Cygler, Miroslaw., Joseph D Schrag., Joel L Sussman., Michal Harel., Israel Silman., Mary K Gentry. et Bhupendra P Doctor. 1993. 'Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins', *Protein Science*, 2: 366-82.
- Czaplewski, Lloyd., Richard Bax., Martha Clokie., Mike Dawson., Heather Fairhead., Vincent A Fischetti., Simon Foster., Brendan F Gilmore., Robert EW Hancock. et David Harper. 2016. 'Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review', *The Lancet infectious diseases*, 16: 239-51.
- Czerucka, D., T Piche. et P Rampal. 2007. 'yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*', *Alimentary pharmacology therapeutics*, 26: 767-78.
- da Silva, Evânia Geralda., Maria de Fátima Borges., Clara Medina., Roberta Hilsdorf Piccoli. et Rosane Freitas Schwan. 2005. 'Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits', *FEMS Yeast Research*, 5: 859-65.
- Dacosta, Y. 2000. 'La bio-protection des aliments', *Process*: 36-37.
- Dahl, G. et A Hjort. 1979. "Dromedary pastoralism in Africa and Arabia. The camelid all purpose animal Volum I." In *Proceeding of the Khartoum Workshop on Camels*, 144-60.
- Dahl, Stefan., Freni K Tavarria. et F Xavier Malcata. 2000. 'Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening', *International Dairy Journal*, 10: 255-62.
- Datta, Suprama., David J Timson. et Uday S Annapure. 2017. 'Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*', *Journal of the Science of Food Agriculture*, 97: 3039-49.
- Davidson, P Michael., John N Sofos. et A Larry Branen. 2005. *Antimicrobials in food* (CRC press)
- Desoubeaux, Guillaume., Nadine François., Daniel Poulain., René Courcol., Jacques Chandenier. et Boualem Sendid. 2010. 'Spectrométrie de masse MALDI-TOF, un nouvel outil que la mycologie médicale ne peut contourner. Exploration préliminaire d'une application concernant l'identification de levures isolées dans un CHU français', *Journal de mycologie médicale*, 20: 263-67.
- Develoux, M. et S Bretagne. 2005. 'Candidoses et levures diverses', *EMC-Maladies infectieuses*, 2: 119-39.
- Dewan, Sailendra. et Jyoti Prakash Tamang. 2007. 'Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products', *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 343-52.
- Dieuleveux, V., S Lemarinier. et M Gueguen. 1998b. 'Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid', *International journal of food microbiology*, 40: 177-83.
- Dieuleveux, V., D Van Der Pyl., J Chataud. et M Gueguen. 1998. 'Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*', *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 800-03.
- Dignard, Daniel., Malcolm Whiteway., Doris Germain., Daniel Tessier. et David Y Thomas. 1991. 'Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene', *Molecular General Genetics MGG*, 227: 127-36.
- Diosma, Gabriela., David E Romanin., María F Rey-Burusco., Alejandra Londero. et Graciela L Garrote. 2014. 'Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization', *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 30: 43-53.
- Djadouni, Fatima. et Mebrouk Kihal. 2012. 'Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods', *Brazilian Archives of Biology Technology*, 55: 435-44.

- Domingues, Lucília., Pedro MR Guimarães. et Carla Oliveira. 2010. 'Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation', *Bioengineered bugs*, 1: 164-71.
- Drider, Djamel., Gunnar Fimland., Yann Héchard., Lynn M McMullen. et Hervé Prévost. 2006. 'The continuing story of class IIa bacteriocins', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 564-82.
- Duarte, AWF., I Dayo-Owoyemi., FS Nobre., Fernando Carlos Pagnocca., Luciana Cristina Silveira Chaud., A Pessoa., Maria das Graças de Almeida Felipe. et LD Sette. 2013. 'Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples', *Extremophiles*, 17: 1023-35.
- Dullius, Anja., Márcia Inês Goettert. et Cláudia Fernanda Volken de Souza. 2018. 'Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—Biotechnological facilitation of industrial scale-up', *Journal of Functional Foods*, 42: 58-74.
- Duman, Deniz Güney., Serhat Bor., Ömer Özütemiz., Tülin Sahin., Dilek Oguz., Fahri Istan., Tümer Vural., Macit Sandkci., Fatih Isksal. et Ilkay Simsek. 2005. 'Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in prevention of antibiotic-associated diarrhoea due to *Helicobacter pylori* eradication', *European journal of gastroenterology hepatology*, 17: 1357-61.
- Durá, MA., M Flores. et F Toldrá. 2004. 'Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages', *Meat science*, 68: 319-28.
- Egan, Kevin., Des Field., Mary C Rea., R Paul Ross., Colin Hill. et Paul D Cotter. 2016. 'Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems?', *Frontiers in microbiology*, 7: 461.
- El Ouardy, Khay. 2013. 'Isolement et caractérisation des bactéries lactiques bactériocinogènes à partir du lait de chamelle de la région de Laâyoune (Sud du Maroc)'.
El-Agamy, Elsayed I. 1994. 'Camel colostrum. 1. Physico-chemical and Microbiological study', *Alexandria Science Exchange*, 15: 209-09.
- El-Agamy, Elsayed I 2009. 'Bioactive components in camel milk.' in, *Bioactive components in milk dairy products* (Wiley Online Library), pp. 159-92.
- El-Agamy, Elsayed I. 2006. 'Camel milk.' in, *Handbook of milk of non-bovine mammals* (Wiley Online Library), pp. 297-344.
- El-Baz, Ashraf F., Hesham A El-Enshasy., Yousseria M Shetaia., Hoda Mahrous., Nor Zalina Othman. et Ahmed E Yousef. 2018. 'Semi-industrial scale production of a new yeast with probiotic traits, *Cryptococcus* sp. YMHS, isolated from the Red Sea', *Probiotics antimicrobial proteins*, 10: 77-88.
- El-Hatmi, Halima., Jean-Michel Girardet., Jean-Luc Gaillard., Mohamed Habib Yahyaoui. et Hamadi Attia. 2007. 'Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum', *Small Ruminant Research*, 70: 267-71.
- Ereifej, Khalil I., Muhammad H Alu'datt., Hana A AlKhalidy., Inteaz Alli. et Taha Rababah. 2011. 'Comparison and characterisation of fat and protein composition for camel milk from eight Jordanian locations', *Food chemistry*, 127: 282-89.
- Erginkaya, Zerrin., E Unal. et Selin Kalkan. 2011. 'Importance of microbial antagonisms about food attribution', *Science against microbial pathogens: communicating current research Kalkan. et technological advances. 3rd edition. Formatex Research center. Spain.*, 2: 1342-48.
- Espinar, MT Fernández., P Martorell., R De Llanos. et Amparo Querol. 2006. 'Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages.' in, *Yeasts in food and beverages* (Springer), pp. 55-82.

- Fabro, MA., HV Milanesio., LM Robert., JL Speranza., M Murphy., G Rodríguez. et R Castañeda. 2006. 'Determination of acidity in whole raw milk: comparison of results obtained by two different analytical methods', *Journal of dairy science*, 89: 859-61.
- Fadda, Maria Elisabetta., Valentina Mossa., Maura Deplano., Maria Barbara Pisano. et Sofia Cosentino. 2017. 'In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics', *LWT*, 75: 100-06.
- FAO. 2008a. 'Agriculture Organization (2009)', *State of the World's Forests. FAO, Rome*.
- FAO, FAOSTAT. 2008b. 'Statistical Databases: Agriculture', *Fisheries, Forestry, Nutrition*.
- FAOstat. 2001. 'Agricultural Organization of the United Nations Statistical Database'. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QA>.
- FAOstat. 2014. 'Food and Agriculture Organization statistical database'. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QA>.
- FAOstat. 2018. 'Agriculture organization corporate statistical database'. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QA>.
- Farah, Z., R Rettenmaier. et D Atkins. 1992. 'Vitamin content of camel milk', *International Journal for Vitamin Nutrition Research*, 62: 30-33.
- Farah, Zakaria. 1993. 'Composition and characteristics of camel milk', *Journal of Dairy Research*, 60: 603-26.
- Fastner, Jutta., Marcel Erhard. et Hans von Döhren. 2001. 'Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp.(Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry', *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5069-76.
- Faticenti, Fabrizio., Jean L Bergere., Pietrino Deiana. et Giovanni A Farris. 1983. 'Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*', *Journal of Dairy Research*, 50: 449-57.
- Faye, Bernard. 1997. 'Guide de l'élevage du dromadaire'.
- Faye, Bernard. 2004. 'Performances et productivité laitière de la chamelle: les données de la littérature', *Lait de chamelle pour l'Afrique*: 7.
- Faye, Bernard. 2009. "L'élevage des grands camélidés: vers un changement de paradigme." In.: Institut de l'élevage.
- Fell, Jack W., Teun Boekhout., Alvaro Fonseca., Gloria Scorzetti. et Adele Stazzell-Tallman. 2000. 'Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis', *International journal of systematic evolutionary microbiology*, 50: 1351-71.
- Fernbach, MA. 1909. 'Sur un poison élaboré par la levure', *Ann Brass Distill*, 12: 361-63.
- Ferreira, AD. et BC Viljoen. 2003. 'Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese', *International journal of food microbiology*, 86: 131-40.
- Fickers, Patrick., P-H Benetti., Yves Waché., Allison Marty., S Mauersberger., MS Smit. et J-M Nicaud. 2005. 'Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications', *FEMS Yeast Research*, 5: 527-43.
- Field, C. R. 1980. 'Camel growth & milk production in Marsabit district, Northern Kenya preliminary report', *Provisional Report, International Foundation for Science*: 215-40.
- Finegold, SYDNEY M., VERA L Sutter. et GLENN E Mathisen. 1983. 'Normal indigenous intestinal flora', *Human intestinal microflora in health disease*, 1: 3-31.
- Fitzpatrick, David A., Mary E Logue., Jason E Stajich. et Geraldine Butler. 2006. 'A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis', *BMC Evolutionary Biology*, 6: 99.
- Fitzpatrick, David. et Edgar Mauricio Medina Tovar. 2011. 'Fungal Genomics', *Biology and Applications*: 67.
- Fitzpatrick, David. 2018. 'Fungal Genomics.' in, *Biology and Applications*, pp. 67.

- Fleet, GH 1990. 'Yeasts in dairy products', *Journal of applied bacteriology*, 68: 199-211.
- Fleet, Graham H 2007. 'Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety', *Current opinion in biotechnology*, 18: 170-75.
- Florey, Howard W 1949. 'Antibiotics', *Oxford University Press*, 1: 20-26.
- Food., Agriculture Organization. et World Health Organization. 2006. *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation* (FAO)
- Fox, SM. 1988. 'Probiotics: Intestinal inoculants for production animals', *Veterinary Medicine*, 8: 806-30.
- França, Rodrigo Correa., Fabricio Rochedo Conceição., Marcelo Mendonça., Louise Haubert., Gabriela Sabadin., Patrícia Diaz de Oliveira., Marta G Amaral., Wladimir Padilha Da Silva. et Ângela Nunes Moreira. 2015. 'Pichia pastoris X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*', *Applied microbiology biotechnology*, 99: 7953-61.
- Frazier, William Carroll. et Dennis C Westhoff. 2003. *Microbiologia de los alimentos* (Acribia)
- Fröhlich-wyder, Marie-therese. 2003. 'Yeasts in dairy products.' in, *Yeasts in food* (Elsevier), pp. 209-37.
- Fukuda, Kenji. 2013. 'Camel milk', *Milk dairy products in human nutrition: Production, composition health: 578-93*.
- Gadaga, Tendekayi H., Anthony N Mutukumira. et Judith A. Narvhus. 2001. 'The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk', *International journal of food microbiology*, 68: 21-32.
- Gardini, F., R Tofalo., N Belletti., L Iucci., G Suzzi., S Torriani., ME Guerzoni. et R Lanciotti. 2006. 'Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese', *Food microbiology*, 23: 641-48.
- Garnier, Lucille., Florence Valence. et Jérôme Mounier. 2017. 'Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update', *Microorganisms*, 5: 42.
- Gasbarrini, Giovanni., Fiorenza Bonvicini. et Annagiulia Gramenzi. 2016. 'Probiotics history', *Journal of clinical gastroenterology*, 50: S116-S19.
- Giger-Reverdin, S., N Bezault., D Sauvant. et G Bertin. 1996. 'Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level', *Animal Feed Science Technology*, 63: 149-62.
- Gill, Harsharnjit S., F Doull., KJ Rutherford. et ML Cross. 2000. 'Immunoregulatory peptides in bovine milk', *British Journal of Nutrition*, 84: 111-17.
- Giuliano, M., M Barza., NV Jacobus. et SL Gorbach. 1987. 'Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on composition of intestinal microflora of humans', *Antimicrobial agents chemotherapy*, 31: 202-06.
- Goel, Ajay Kumar., N Dilbaghi., Dev Vrat Kamboj. et Lokendra Singh. 2006. 'Probiotics: Microbial therapy for health modulation', *Defence Science Journal*, 56: 513.
- Golubev, WI. 2006. 'Antagonistic interactions among yeasts.' in, *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (Springer), pp. 197-219.
- Golubev, Wladyslav. et Yuri Shabalin. 1994. 'Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*', *FEMS Microbiology Letters*, 119: 105-10.
- Gomes, Ana MP. et F Xavier Malcata. 1999. '*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics', *Trends in Food Science Technology*, 10: 139-57.
- Gomes, Joseph., Isidore Gomes. et Walter Steiner. 2000. 'Thermolabile xylanase of the Antarctic yeast *Cryptococcus adeliae*: production and properties', *Extremophiles*, 4: 227-35.
- Gratia, A. 1925. 'Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coilbacille', *CR Seances Soc. Biol. Fil.*, 93: 1040-41.

- Gross, Erhard. et John L Morell. 1971. 'Structure of nisin', *Journal of the American Chemical Society*, 93: 4634-35.
- Guerzoni, ME., L Vannini., C Chaves Lopez., M Gobbetti. et R Lanciotti. 1998. "Yarrowia lipolytica as potential ripening agent in milk products." In *Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects, Copenhagen (Denmark), 2-3 Sep 1996*. International Dairy Federation.
- Gupta, Anupama., Nivedita Sharma. et Neha Gautam. 2020. 'Preservative potential of purified bacteriocin produced from *Brevibacillus borstelensis* AG1 isolated from Marcha–A traditional wine starter culture cake in tomato paste', *Journal of Microbiology, Biotechnology Food Sciences*, 9: 448-51.
- Haben Fesseha, MVSc 2019. 'Probiotics and Its Potential Role in Poultry Production: A', *genus*, 20: 22.
- Haddad, Imen., Massimo Mozzon., Rosanna Strabbioli. et Natale G Frega. 2011. 'Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of triacylglycerols molecular species in camel milk (*Camelus dromedarius*)', *International Dairy Journal*, 21: 119-27.
- Haddadin, Malik SY., Sana I Gammoh. et Richard K Robinson. 2008. 'Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan', *Journal of Dairy Research*, 75: 8-12.
- Hadeball, W 1991. 'Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from yeasts', *Acta Biotechnologica*, 11: 159-67.
- Hammes, Walter P. et Rudi F Vogel. 1995. 'The genus *lactobacillus*.' in, *The genera of lactic acid bacteria* (Springer), pp. 19-54.
- Hanes, Steven D., Virginia E Burn., Stephen L Sturley., Donald J Tipper. et Keith A Bostian. 1986. 'Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 1675-79.
- Hassan, AA., AE Hagrass., KA Soryal. et SA El-Shabrawy. 1987. 'Physico-chemical properties of camel milk during lactation period in Egypt', *Egyptian Journal of Food Science*.
- Hassan, Rihab A., IME El Zubeir. et SA Babiker. 2008. 'Chemical and microbial measurements of fermented camel milk (Gariss) from transhumance and Nomadic herds in Sudan', *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 2: 800-04.
- Hatoum, Rima., Steve Labrie. et Ismail Fliss. 2013. 'Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts', *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5: 8-17.
- Havenaar, Robert., Bart Ten Brink. et Jos HJ Huis. 1992. 'Selection of strains for probiotic use.' in, *Probiotics* (Springer), pp. 209-24.
- Hayduck, F 1909. 'Uber einen Hefengiftstoff in Hefe', *Wochenschr. Brau*, 26: 677-79.
- Headon, DR. et G Walsh. 1994. 'The industrial production of enzymes', *Biotechnology advances*, 12: 635-46.
- Heddle, Jonathan G., Stephen J Blance., Deborah B Zamble., Florian Hollfelder., Deborah A Miller., Lois M Wentzell., Christopher T Walsh. et Anthony Maxwell. 2001. 'The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition', *Journal of molecular biology*, 307: 1223-34.
- Herring, AJ. et EA Bevan. 1974. 'Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of General Virology*, 22: 387-94.
- Hibbett, David S., Manfred Binder., Joseph F Bischoff., Meredith Blackwell., Paul F Cannon., Ove E Eriksson., Sabine Huhndorf., Timothy James., Paul M Kirk. et Robert Lücking. 2007. 'A higher-level phylogenetic classification of the Fungi', *Mycological research*, 111: 509-47.

- Hoelzer, Karin., Nora Wong., Joe Thomas., Kathy Talkington., Elizabeth Jungman. et Allan Coukell. 2017. 'Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence?', *BMC veterinary research*, 13: 211.
- Holzappel, WH., R Geisen. et U Schillinger. 1995. 'Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes', *International journal of food microbiology*, 24: 343-62.
- Houde, Alain., Ali Kademi. et Danielle Leblanc. 2004. 'Lipases and their industrial applications', *Applied biochemistry biotechnology*, 118: 155-70.
- Hutkins, Robert W. 2008. *Microbiology and technology of fermented foods* (John Wiley & Sons)
- Indra, R. et B Erdenebaatar. 1998. 'Camel's milk processing and its consumption patterns in Mongolia', *Colloques-CIRAD*: 257-61.
- Irlinger, Françoise. et Jérôme Mounier. 2009. 'Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety', *Current opinion in biotechnology*, 20: 142-48.
- Ismail, M. D.. et S. E. Al Mutairi. 1998. 'Milk production potential of dairy camels in Northern Saudi Arabia', *Colloques-CIRAD*: 35-40.
- Izadpanah, Arash. et Richard L Gallo. 2005. 'Antimicrobial peptides', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52: 381-90.
- Jacob, Francois., André Lwoff., A Siminovitch. et E Wollman. 1953. 'Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie', *Ann. Inst. Pasteur*, 84: 222-24.
- Janisiewicz, Wojciech J. et Lise Korsten. 2002. 'Biological control of postharvest diseases of fruits', *Annual review of phytopathology*, 40: 411-41.
- Jay, James M., Martin J Loessner. et David A Golden. 2005. 'Nondairy fermented foods and products', *Modern Food Microbiology*: 175-95.
- Jeevaratnam, K., M Jamuna. et AS Bawa. 2005. 'Biological preservation of foods—Bacteriocins of lactic acid bacteria'.
- Jin, Z., PL Shinde., YX Yang., JY Choi., SY Yoon., T-W Hahn., HT Lim., YK Park., KS Hahm. et JW Joo. 2009. 'Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an alternative to antibiotics in weanling pigs', *Livestock Science*, 124: 26-32.
- Karuso, Peter. 2010. '9.14 - Modern Methods for the Isolation of Natural Product Receptors.' in Hung-Wen Liu et Lew Mander (eds.), *Comprehensive Natural Products II* (Elsevier: Oxford), pp. 513-67.
- Kavanagh, Kevin. 2011. 'Fungal fermentations systems and products', *Biology and Applications*: 125.
- Kavanagh, Kevin. 2017. *Fungi: biology and applications* (John Wiley & Sons)
- Kebede, Ameha., BC Viljoen., TH Gadaga., JA Narvhus. et A Lourens-Hattingh. 2007. 'The effect of container type on the growth of yeast and lactic acid bacteria during production of Sethemi, South African spontaneously fermented milk', *Food Research International*, 40: 33-38.
- Kesarcodi-Watson, Aditya., Heinrich Kaspar., M Josie Lategan. et Lewis Gibson. 2008. 'Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes', *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Khajuria, Robinka. et Shalini Singh. 2018. 'Bacterial Metabolites in Food Preservation.' in, *Microbial Cell Factories* (CRC Press), pp. 277-300.
- Kirk, PM., PF Cannon., JC David. et JA Stalpers. 2001. 'Dictionary of the fungi 9th edn', *CABI, Wallingford*.
- Klaenhammer, Todd R. 1993. 'Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria', *FEMS microbiology reviews*, 12: 39-85.

- Klaubauf, Sylvia., Erich Inselsbacher., Sophie Zechmeister-Boltenstern., Wolfgang Wanek., Richard Gottsberger., Joseph Strauss. et Markus Gorfer. 2010. 'Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria', *Fungal Diversity*, 44: 65-75.
- Kolecka, Anna., Kantarawee Khayhan., Marizeth Groenewald., Bart Theelen., Michael Arabatzis., Aristeia Velegraki., Markus Kostrzewa., Mihai Mares., Saad J Taj-Aldeen. et Teun Boekhout. 2013. 'Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry', *Journal of clinical microbiology*, 51: 2491-500.
- Kõljalg, Urmas., Karl-Henrik Larsson., Kessy Abarenkov., R Henrik Nilsson., Ian J Alexander., Ursula Eberhardt., Susanne Erland., Klaus Høiland., Rasmus Kjølner. et Ellen Larsson. 2005. 'UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi', *New Phytologist*, 166: 1063-68.
- Konuspayeva, Gaukhar 2007. 'Variabilité physico-chimique et biochimique du lait des grands camélidés (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* et hybrides) au Kazakhstan', Doctorat d'état, Université Montpellier II.
- Konuspayeva, Gaukhar., Bernard Faye. et Gérard Loiseau. 2009. 'The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data', *Journal of Food Composition Analysis*, 22: 95-101.
- Konuspayeva, Gaukhar., Bernard Faye., Gérard Loiseau., Meiramkul Narmuratova., Anatoly Ivashchenko., Aliya Meldebekova. et Sydyk Davletov. 2010. 'Physiological change in camel milk composition (*Camelus dromedarius*) 2: physico-chemical composition of colostrum', *Tropical animal health production*, 42: 501-05.
- Krishnakumar, V. et IR Gordon. 2001. 'Probiotics: Challenges and opportunities', *Dairy industries international*, 66: 38-40.
- Kudoh , Yasufumi., Shigeki MATSUDA., Keiji IGOSHI. et Tomoyuki OKI. 2001. 'Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953', *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48: 44-50.
- Kumar, Vineet. 2018. 'Mechanism of microbial heavy metal accumulation from a polluted environment and bioremediation.' in, *Microbial cell factories* (CRC Press), pp. 149-74.
- Kumura, Haruto., Y Tanoue., M Tsukahara., T Tanaka. et K Shimazaki. 2004. 'Screening of dairy yeast strains for probiotic applications', *Journal of dairy science*, 87: 4050-56.
- Kurtzman, Cletus., Jack W Fell. et Teun Boekhout. 2011. *The yeasts: a taxonomic study* (Elsevier)
- Kurtzman, Cletus P. et Christie J Robnett. 1998. 'Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences', *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-71.
- Kurtzman, Cletus P. et Christie J Robnett. 2003. 'Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses', *FEMS Yeast Research*, 3: 417-32.
- Kutty, Sreedevi N. et Rosamma Philip. 2008. 'Marine yeasts—a review', *Yeast*, 25: 465-83.
- Lacroix, Christophe. 2010. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* (Elsevier)
- Lagneau, PE., K Lebtahi. et Danielle Swinne. 1996. 'Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium', *Mycopathologia*, 135: 99-102.
- Laithier, C 2012. 'L'ouvrage «Microflore du lait cru—Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation», *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*.

- Lavoie, Karine., Marilyne Touchette., Daniel St-Gelais. et Steve Labrie. 2012. 'Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec', *Dairy science technology*, 92: 455-68.
- LeBlanc, JG., Chantal Matar., JC Valdez., J LeBlanc. et G Perdigon. 2002. 'Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*', *Journal of dairy science*, 85: 2733-42.
- Lee, Jong-Kook., Ramamourthy Gopal., Chang Ho Seo., Hyeonsook Cheong. et Yoonkyung Park. 2012. 'Isolation and purification of a novel deca-antifungal peptide from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung) against *Candida albicans*', *International journal of molecular sciences*, 13: 4021-32.
- Lenoir, J., G Lamberet., JL Schmidt. et C Tourneur. 1985. 'La maîtrise du bioréacteur fromage', *Biofutur*, 41.
- Li, Yin., Gongyuan Wei. et Jian Chen. 2004. 'Glutathione: a review on biotechnological production', *Applied microbiology biotechnology*, 66: 233-42.
- Li, Yun., Faizan A Sadiq., TongJie Liu., JiCheng Chen. et GuoQing He. 2015. 'Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*', *Journal of Functional Foods*, 16: 278-88.
- Lim, SL. et ST Tay. 2011. 'Research Note Diversity and killer activity of yeasts in Malaysian fermented food samples', *Tropical biomedicine*, 28: 438-43.
- Liu, Wenjun., Huili Pang., Heping Zhang. et Yimin Cai. 2014. 'Biodiversity of lactic acid bacteria.' in, *Lactic acid bacteria* (Springer), pp. 103-203.
- Liu, Yajuan J., Matthew C Hodson. et Benjamin D Hall. 2006. 'Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes', *BMC Evolutionary Biology*, 6: 74.
- Liu, Yuying., Jane J Alookaran. et J Marc Rhoads. 2018. 'Probiotics in Autoimmune and Inflammatory Disorders'.
- Lodder, J 1970. 'General classification of the yeasts', *The Yeasts, a Taxonomic Study*: 1-33.
- Longo-Hammouda, Fatma Hasna., Oum Elkheir Siboukheur. et Abdelmadjid Chehma. 2007. 'Aspects nutritionnels des pâturages les plus appréciés par *Camelus dromedarius* en Algérie', *Cahiers Agricultures*, 16: 477-83 (1).
- Lore, Tezira A., Samuel K Mbugua. et John Wangoh. 2005. 'Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product', *LWT-Food Science Technology*, 38: 125-30.
- Lutzoni, François., Frank Kauff., Cymon J Cox., David McLaughlin., Gail Celio., Bryn Dentinger., Mahajabeen Padamsee., David Hibbett., Timothy Y James. et Elisabeth Baloch. 2004. 'Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits', *American journal of botany*, 91: 1446-80.
- Makower, M. et EA Bevan. 1963. "The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).". In *Proc Int Congr Genet XI*, 235-44.
- Mandel, David R., Katy Eichas. et Judith Holmes. 2010. 'Bacillus coagulans: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial', *BMC complementary alternative medicine*, 10: 1.
- Mansour, Soulaf. 2009. 'Transcriptomic study of the yeast *Yarrowia lipolytica* metabolism in a cheese ecosystem'.
- Marquina, D., A Santos. et J Peinado. 2002. 'Biology of killer yeasts', *International Microbiology*, 5: 65-71.
- Martín, Rocío., Mónica Olivares., María L Marín., Leonides Fernández., Jordi Xaus. et Juan M Rodríguez. 2005. 'Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk', *Journal of Human Lactation*, 21: 8-17.

- Martin-Visscher, Leah A., Marco J van Belkum., Sylvie Garneau-Tsodikova., Randy M Whittal., Jing Zheng., Lynn M McMullen. et John C Vederas. 2008. 'Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307', *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4756-63.
- Mason, IL 1979. 'Origin, history and distribution of domestic camels', *Camels, Provisional Report, International Foundation for Science, Stockholm*: 21-34.
- Matsuzaki, Katsumi. 2009. 'Control of cell selectivity of antimicrobial peptides', *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, 1788: 1687-92.
- Maurad, Kacem. et Kaid Harche Meriem. 2008. 'Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria', *Grasas y aceites*, 59: 218-24.
- McKelvey, Shauna M. et Richard A Murphy. 2011. 'Biotechnological use of fungal enzymes', *Biology Applications*: 179.
- Metchnikoff, E 1907. 'Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction', *The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London*: 161-83.
- Metlitskaya, Anastasia., Teymur Kazakov., Aigar Kommer., Olga Pavlova., Mette Praetorius-Ibba., Michael Ibba., Igor Krasheninnikov., Vyacheslav Kolb., Inessa Khmel. et Konstantin Severinov. 2006. 'Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 18033-42.
- Mishra, Saroj. et Richa Baranwal. 2009. 'Yeast genetics and biotechnological applications.' in, *Yeast biotechnology: diversity and applications* (Springer), pp. 323-55.
- Mitsuoka, Tomotari 1992. 'Intestinal flora and aging', *NUTRITION REVIEWS-WASHINGTON*, 50: 438-38.
- Mohamed, MI., YA Maareck., Soha S Abdel-Magid. et IM Awadalla. 2009. 'Feed intake, digestibility, rumen fermentation and growth performance of camels fed diets supplemented with a yeast culture or zinc bacitracin', *Animal Feed Science Technology*, 149: 341-45.
- Molimard, P. et HE Spinnler. 1996. 'Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties', *Journal of dairy science*, 79: 169-84.
- Molimard, P., L Vassal., I Bouvier. et HE Spinnler. 1995. 'Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l'affinage de fromages expérimentaux à pâte molle de type camembert', *Le Lait*, 75: 3-16.
- Möller, Niels Peter., Katharina Elisabeth Scholz-Ahrens., Nils Roos. et Jürgen Schrezenmeir. 2008. 'Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects', *European journal of nutrition*, 47: 171-82.
- Molyneux, Philip. 2004. 'The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity', *Songklanakarin J. Sci. technol*, 26: 211-19.
- Moré, Margret I. et Alexander Swidsinski. 2015. '*Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review', *Clinical and experimental gastroenterology*, 8: 237.
- Mrak, EM., MW Miller. et HJ Phaff. 1978. *The Life of Yeasts* (Harvard University Press)
- Mukhopadhyay, Jayanta., Elena Sineva., Jennifer Knight., Ronald M Levy. et Richard H Ebright. 2004. 'Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel', *Molecular cell*, 14: 739-51.
- Naimah, Alaa Kareem., Alaa Jabbar Abd Al-Manhel. et Manar Jabbar Al-Shawi. 2018. 'Isolation, purification and characterization of antimicrobial peptides produced from *Saccharomyces boulardii*', *International Journal of Peptide Research Therapeutics*, 24: 455-61.

- Narvhus, Judith A. et Tendekayi Henry Gadaga. 2003. 'The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review', *International journal of food microbiology*, 86: 51-60.
- Nes, Ingolf F. 2011. 'History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria.' in, *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* (Springer), pp. 3-12.
- Ni, He., Lin Li., Guang Liu. et Song-Qing Hu. 2012. 'Inhibition mechanism and model of an angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory hexapeptide from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)', *PLOS ONE*, 7.
- Niklison-Chirou, María V., Fernando Dupuy., Liliana B Pena., Susana M Gallego., Maria Laura Barreiro-Arcos., Cesar Avila., Clarisa Torres-Bugeau., Beatriz E Arcuri., Augusto Bellomio. et Carlos Minahk. 2010. 'Microcin J25 triggers cytochrome c release through irreversible damage of mitochondrial proteins and lipids', *The international journal of biochemistry cell biology*, 42: 273-81.
- Njage, PMK., S Dolci., C Jans., J Wangoh., C Lacroix. et L Meile. 2011. 'Characterization of yeasts associated with camel milk using phenotypic and molecular identification techniques', *Research Journal of Microbiology*, 6: 678.
- Ochangco, Honeylet Sabas., Amparo Gamero., Ida M Smith., Jeffrey E Christensen., Lene Jespersen. et Nils Arneborg. 2016. 'In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties', *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 32: 141.
- Ochigava, Irma., Phillip J Collier., Graeme M Walker. et Regine Hakenbeck. 2011. '*Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*', *Antonie van Leeuwenhoek*, 99: 559-66.
- Ogunremi, OR., AI Sanni. et R Agrawal. 2015. 'Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products', *Journal of applied microbiology*, 119: 797-808.
- Omer, Rea Haroun. et Abdullah Hamid Eltinay. 2009. 'Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage', *Pakistan journal of nutrition*, 8: 607-10.
- Ouiddir, Massinissa., Guessas Bettache., Marcia Leyva Salas., Audrey Pawtowski., Christelle Donot., Samira Brahim., Kihel Mabrouk., Emmanuel Coton. et Jérôme Mounier. 2019. 'Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products', *Food microbiology*, 82: 160-70.
- Panesar, Parmjit S., Shweta Kumari. et Reeba Panesar. 2010. 'Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries', *Enzyme Research*, 2010.
- Papadopoulos, Marios C., Paulo M Abel., Dan Agranoff., August Stich., Edward Tarelli., B Anthony Bell., Timothy Planche., Alison Loosemore., Samira Saadoun. et Peter Wilkins. 2004. 'A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis', *The Lancet*, 363: 1358-63.
- Park, Young W., George FW Haenlein. et William L Wendorff. 2006. *Handbook of milk of non-bovine mammals* (Wiley Online Library: Ames).469
- Parrella, Alfredo., Emanuela Caterino., Margherita Cangiano., Emma Criscuolo., Chiara Russo., Margherita Lavorgna. et Marina Isidori. 2012. 'Antioxidant properties of different milk fermented with lactic acid bacteria and yeast', *International journal of food science technology*, 47: 2493-502.
- Pasteur, Louis. 1987. 'Charbon et septicémie', *CR Soc Biol Paris*, 1877: 85-101.
- Pereira-Dias, S., ME Potes., A Marinho., M Malfeito-Ferreira. et V Loureiro. 2000. 'Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese', *International journal of food microbiology*, 60: 55-63.

- Piano, Serenella., Valentina Neyrotti., Quirico Migheli. et M Lodovica Gullino. 1997. 'Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis postharvest* rot of apple', *Postharvest Biology Technology*, 11: 131-40.
- Pignède, Georges., Huijie Wang., Franck Fudalej., Claude Gaillardin., Michel Seman. et Jean-Marc Nicaud. 2000. 'Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*', *Journal of Bacteriology*, 182: 2802-10.
- Pimenta, RS., PB Morais., CA Rosa. et A Correa. 2009. 'Utilization of yeasts in biological control programs.' in, *Yeast biotechnology: diversity and applications* (Springer), pp. 199-214.
- Poll, Christian., Thomas Brune., Dominik Begerow. et Ellen Kandeler. 2010. 'Small-scale diversity and succession of fungi in the detritusphere of rye residues', *Microbial ecology*, 59: 130-40.
- Prillinger, Hansjörg., Gunda Kraepelin., Ksenija Lopandic., Wolfgang Schweigkofler., Orsolya Molnár., Franz Weigang. et Mike M Dreyfuss. 1997. 'New species of *Fellomyces* isolated from epiphytic lichen species', *Systematic applied microbiology*, 20: 572-84.
- Prillinger, Hansjörg., Ksenija Lopandic., Wolfgang Schweigkofler., Robert Deak., Henk JM Aarts., Robert Bauer., Katja Sterflinger., Günther F Kraus. et Anna Maraz. 2002. 'Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Ascomycota and Basidiomycota', *Chemical immunology*, 81: 207-95.
- Put, Henriëtte MC., J De Jong., FEMJ Sand. et AM Van Grinsven. 1976. 'Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks', *Journal of applied bacteriology*, 40: 135-52.
- Quan, Shuang., Harutoshi Tsuda. et Taku Miyamoto. 2008. 'Angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *lactobacillus helveticus* 130b4 from camel milk in inner mongolia, china', *Journal of the Science of Food Agriculture*, 88: 2688-92.
- Quast, Christian., Elmar Pruesse., Pelin Yilmaz., Jan Gerken., Timmy Schweer., Pablo Yarza., Jörg Peplies. et Frank Oliver Glöckner. 2012. 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools', *Nucleic acids research*, 41: D590-D96.
- Querol, Amparo. et Graham H Fleet. 2006. *Yeasts in Food and Beverages* (Springer Science & Business Media)
- Quigley, Lisa., Orla O'Sullivan., Catherine Stanton., Tom P Beresford., R Paul Ross., Gerald F Fitzgerald. et Paul D Cotter. 2013. 'The complex microbiota of raw milk', *FEMS microbiology reviews*, 37: 664-98.
- Rahman, Nurgul., Chen Xiaohong., Feng Meiqin. et Dong Mingsheng. 2009. 'Characterization of the dominant microflora in naturally fermented camel milk shubat', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1941-46.
- Rai, Amit Kumar., Reena Kumari., Samurailatpam Sanjukta. et Dinabandhu Sahoo. 2016. 'Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi', *Bioresource technology*, 219: 239-45.
- Ramet, JP. 1993. *La technologie des fromages au lait de dromadaire (Camelus dromedarius)* (Food & Agriculture Org.)
- Rastall, RA 2004. 'Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance', *The Journal of nutrition*, 134: 2022S-26S.
- Rea, Mary C., R Paul Ross., Paul D Cotter. et Colin Hill. 2011. 'Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria.' in, *Prokaryotic antimicrobial peptides* (Springer), pp. 29-53.
- Rebuffat, Sylvie. 2011. 'Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?' in, *Prokaryotic antimicrobial peptides* (Springer), pp. 55-72.

- Rech, R., C F Cassini., A. Secchi. et M A Z Ayub. 1999. 'Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*', *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 23: 91-96.
- Renye, John A., George A Somkuti. et Dennis H Steinberg. 2019. 'Thermophilin 109 is a naturally produced broad spectrum bacteriocin encoded within the blp gene cluster of *Streptococcus thermophilus*', *Biotechnology letters*, 41: 283-92.
- Ries, Daniel. 2009. 'Studies on the antioxidant activity of milk proteins in model oil-in-water emulsions: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology, Riddet Institute, Massey University, Palmerston North, New Zealand', Massey University.
- Riley, MA 2009. 'Bacteriocins, biology, ecology, and evolution', *Encyclopedia of microbiology*: 32-44.
- Riordan, James F. 2003. 'Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives', *Genome biology*, 4: 225.
- Ripinsky, Michael 1983. 'Camel ancestry and domestication in Egypt and the Sahara', *Archaeology New York, NY*, 36: 21-27.
- Rischkowsky, B. et D Pilling. 2008. *L'état des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde* (FAO)
- Robinson, R.J., TH Lord., JA Johnson. et BS Miller. 1958. 'Studies on the decrease of the bacterial population in pre-ferments', *CEREAL CHEMISTRY*, 35: 306-17.
- Robinson, R.J., BS Miller., JA Johnson., B Curnutte. et TH Lord. 1962. 'STUDIES OF 2 POLYPEPTIDE ANTIBIOTICS ELABORATED BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE', *CEREAL CHEMISTRY*, 39: 183-&.
- Rodicio, Rosaura. et Jürgen J. Heinisch. 2013. 'Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*', 30: 165-77.
- Rokas, Antonis., Barry L Williams., Nicole King. et Sean B Carroll. 2003. 'Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies', *Nature*, 425: 798.
- Roostita, R. et GH Fleet. 1996. 'The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses', *International journal of food microbiology*, 28: 393-404.
- Roy, Molay Kumar., Yasuo Watanabe. et Youichi Tamai. 2000. 'Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting-enzyme activity', *Biotechnology applied biochemistry*, 31: 95-100.
- Ruhe, Zachary C., David A Low. et Christopher S Hayes. 2013. 'Bacterial contact-dependent growth inhibition', *Trends in microbiology*, 21: 230-37.
- Saito, Tadao. 2008. 'Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins.' in, *Bioactive components of milk* (Springer), pp. 295-317.
- Salminen, S., E Isolauri. et E Salminen. 1996. 'Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges', *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 347-58.
- Santos, A., D Marquina., JA Leal. et JM Peinado. 2000. '(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin', *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1809-13.
- Sawaya, WN., JK Khalil., A Al-Shalhat. et Al-Mohammad. 1984a. 'Chemical composition and nutritional quality of camel milk', *Journal of Food Science*, 49: 744-47.
- Sayyed, RZ. et SB Chincholkar. 2009. 'Siderophore-producing *Alcaligenes feacalis* exhibited more biocontrol potential vis-à-vis chemical fungicide', *Current microbiology*, 58: 47-51.
- Sazawal, Sunil., Girish Hiremath., Usha Dhingra., Pooja Malik., Saikat Deb. et Robert E Black. 2006. 'Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of

- masked, randomised, placebo-controlled trials', *The Lancet infectious diseases*, 6: 374-82.
- Schaffrath, Raffael. et Friedhelm Meinhardt. 2005. 'Kluyveromyces lactis zymocin and other plasmid-encoded yeast killer toxins.' in, *Microbial protein toxins* (Springer), pp. 133-55.
- Schillinger, U., B Becker., G Vignolo. et WH Holzapfel. 2001. 'Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu', *International journal of food microbiology*, 71: 159-68.
- Schmitt, Manfred J. et Frank Breinig. 2006. 'Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection', *Nature Reviews Microbiology*, 4: 212-21.
- Schmitt, Manfred J. et Donald J Tipper. 1995. 'Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an α/β heterodimeric protein toxin', *Virology*, 213: 341-51.
- Schoch, Conrad L., Keith A Seifert., Sabine Huhndorf., Vincent Robert., John L Spouge., C André Levesque., Wen Chen. et Fungal Barcoding Consortium. 2012. 'Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 6241-46.
- Schwartz, HJ. et M Dioli. 1992. *The one-humped camel in Eastern Africa. A pictorial guide to diseases, health care and management* (Margraf: agris.fao.org).320 p.
- Seddik, Hamza Ait., Alexandre Ceugniesz., Farida Bendali., Benoit Cudennec. et Djamel Drider. 2016. 'Yeasts isolated from Algerian infants's feces revealed a burden of *Candida albicans* species, non-*Candida albicans* species and *Saccharomyces cerevisiae*', *Archives of microbiology*, 198: 71-81.
- Seifert, Keith A 2009. 'Progress towards DNA barcoding of fungi', *Molecular ecology resources*, 9: 83-89.
- Sgorbati, B., B Biavati. et D Palenzona. 1995. 'The genus *Bifidobacterium*.' in, *The genera of lactic acid bacteria* (Springer), pp. 279-306.
- Sharma, Deepansh., Arun Beniwal., Priyanka Saini., Shailly Kapil. et Shilpa Vij. 2018. 'Engineering Microbial Cell Factories for Improved Whey Fermentation to Produce Bioethanol.' in, *Microbial Cell Factories* (CRC Press), pp. 353-70.
- Sharma, Deepansh. et Baljeet Singh Saharan. 2018. *Microbial cell factories* (CRC Press)
- Shori, Amal B 2013. 'Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk', *Journal of Taibah University for Science*, 7: 202-08.
- Siboukeur, O. 2007. 'Etude du lait camelin collecté localement: caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques; aptitudes à la coagulation', thèse de doctorat, institut national agronomique El-Harrach-Algérie, p 22.
- Sieuwerts, Sander., Frank AM De Bok., Jeroen Hugenholtz. et Johan ET van Hylckama Vlieg. 2008. 'Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches', *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4997-5007.
- Simpson, George Gaylord 1945. 'The principles of classification and a classification of mammals', *Bull. Amer. Museum Nat. History.*, 85.
- Singh, Abhishek Kumar. et Mausumi Mukhopadhyay. 2012. 'Overview of fungal lipase: a review', *Applied biochemistry Biotechnology advances*, 166: 486-520.
- Smith, Ida Mosbech., A Baker., Nils Arneborg. et Lene Jespersen. 2015. 'Non-*Saccharomyces* yeasts protect against epithelial cell barrier disruption induced by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*', *Letters in applied microbiology*, 61: 491-97.
- Soccol, Carlos Ricardo., Luciana Porto de Souza Vandenberghe., Michele Rigon Spier., Adriane Bianchi Pedroni Medeiros., Caroline Tiemi Yamaguishi., Juliano De Dea Lindner., Ashok Pandey. et Vanete Thomaz-Soccol. 2010. 'The potential of probiotics: a review', *Food Technology Biotechnology*, 48: 413-34.

- Soleymanzadeh, Nazila., Saeed Mirdamadi. et Mehran Kianirad. 2016. 'Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (Chal)', *Dairy science technology*, 96: 443-57.
- Stackebrandt, EaBMG. et Brett M Goebel. 1994. 'Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology', *International journal of systematic evolutionary microbiology*, 44: 846-49.
- Stansfield, Ian. et Mike Stark. 2011. *Yeast gene analysis* (Elsevier)
- Šušković, Jagoda., Blaženka Kos., Jasna Beganović., Andreja Leboš Pavunc., Ksenija Habjanič. et Srećko Matošić. 2010. 'Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria', *Food Technology Biotechnology*, 48: 296-307.
- Suzuki, Chise. 2005. 'Acidophilic structure and killing mechanism of the *Pichia farinosa* killer toxin SMKT.' in, *Microbial Protein Toxins* (Springer), pp. 189-214.
- Suzzi, G., MT Lanorte., F Galgano., C Andrighetto., A Lombardi., R Lanciotti. et ME Guerzoni. 2001. 'Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese', *International journal of food microbiology*, 69: 69-77.
- Suzzi, Giovanna., Maria Schirone., Maria Martuscelli., Monica Gatti., Maria Emanuela Fornasari. et Erasmo Neviani. 2003. 'Yeasts associated with Manteca', *FEMS Yeast Research*, 3: 159-66.
- Sweet, Louise E. 1965. 'Camel pastoralism in North Arabia and the minimal camping unit', *Man, Culture and Animals: The Role of Animals in Human Ecological Adjustments*, American Association for the Advancements of Science, Washington DC: 121-29.
- Takasuka, Tsuyoshi., Tadazumi Komiyama., Yasuhiro Furuichi. et Takahide Watanabe. 1995. 'Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*', *Cellular molecular biology research*, 41: 575-81.
- Tamang, Jyoti Prakash. et Graham H Fleet. 2009. 'Yeasts diversity in fermented foods and beverages.' in, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (Springer), pp. 169-98.
- Tang, Jane S.. et Patrick M. Gillevet. 2003. 'Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*', *Journal of Medical Microbiology*, 53: 995-97.
- Tannock, Gerald W. 1999. 'Analysis of the intestinal microflora: a renaissance.' in, *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (Springer), pp. 265-78.
- Tavanti, Arianna., Amanda D Davidson., Neil AR Gow., Martin CJ Maiden. et Frank C Odds. 2005. '*Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III', *Journal of clinical microbiology*, 43: 284-92.
- Theisen, Simone., Elisabeth Molkenau. et Manfred J Schmitt. 2000. 'Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential', *Journal of microbiology biotechnology*, 10: 547-50.
- Tissier, Henry. 1907. *Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin*
- Tourette, Isabelle., Samir Messad. et Bernard Faye. 2002. 'Impact des pratiques de traite des éleveurs sur la qualité sanitaire du lait de chamelle en Mauritanie'.
- Urashima, Tadasu., M Kitaoka., S Asakuma. et M Messer. 2009. 'Milk oligosaccharides.' in, *Advanced dairy chemistry* (Springer), pp. 295-349.
- Usyk, Mykhaylo., Christine P Zolnik., Hitesh Patel., Michael H Levi. et Robert D Burk. 2017. 'Novel ITS1 fungal primers for characterization of the mycobiome', *MSphere*, 2: e00488-17.
- Vacheyrou, Mallory., Anne-Cécile Normand., Philippe Guyot., Carole Cassagne., Renaud Piarroux. et Yvette Bouton. 2011. 'Cultivable microbial communities in raw cow milk

- and potential transfers from stables of sixteen French farms', *International journal of food microbiology*, 146: 253-62.
- Van den Tempel, T. et M Jakobsen. 2000. 'The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu', *International Dairy Journal*, 10: 263-70.
- Vasdinyei, R. et T Deak. 2003. 'Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques', *International journal of food microbiology*, 86: 123-30.
- Verschuere, Laurent., Geert Rombaut., Patrick Sorgeloos. et Willy Verstraete. 2000. 'Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655-71.
- Viljoen, Bennie C. 2006. 'Yeast ecological interactions. Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents.' in, *Yeasts in food and beverages* (Springer), pp. 83-110.
- Vyas, Pratibha., Robin Joshi., KC Sharma., Praveen Rahi., Ashu Gulati. et Arvind Gulati. 2010. 'Cold-adapted and rhizosphere-competent strain of *Rahnella* sp. with broad-spectrum plant growth-promotion potential', *Microbiol Biotechnol*, 20: 1724-34.
- Wangoh, J., Z Farah. et Z Puhan. 1998. 'Iso-electric focusing of camel milk proteins', *International Dairy Journal*, 8: 617-21.
- Wardeh, MF 2004. 'Classification of the dromedary camels', *J. Camel Sci*, 1: 1-7.
- Webster, J. 1980. 'Introduction to fungi'. Cambridge University Press.
- Webster, John. 1992. 'Anamorph-teleomorph relationships.' in, *The ecology of aquatic hyphomycetes* (Springer), pp. 99-117.
- Webster, John. et Roland Weber. 2007. *Introduction to fungi* (Cambridge University Press)
- Wei, Dong. 1980. "Chinese camels and their productivities." In *Workshop on camels, Khartoum, Sudan, 18-20 December 1979.*: International Foundation for Science.
- Weiler, Frank., Klaus Rehfeldt., Frank Bautz. et Manfred J Schmitt. 2002. 'The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host', *Molecular microbiology*, 46: 1095-105.
- Weiler, Frank. et Manfred J Schmitt. 2003. 'Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells', *FEMS Yeast Research*, 3: 69-76.
- Whiteway, Malcolm. et Catherine Bachewich. 2011. 'Fungal genetics', *Biology Applications*: 37.
- Willett, Julia LE., Grant C Gucinski., Jackson P Fatherree., David A Low. et Christopher S Hayes. 2015. 'Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple independent cell-entry pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 11341-46.
- Willey, Joanne M., Linda Sherwood. et Christopher J Woolverton. 2008. 'Prescott, Harley, and Klein's microbiology'.
- Wilson, RT. 1984. "The camel. First edit." In.: Longman group Ltd. London and New York.
- Wouters, Jan TM., Eman HE Ayad., Jeroen Hugenholtz. et Gerrit Smit. 2002. 'Microbes from raw milk for fermented dairy products', *International Dairy Journal*, 12: 91-109.
- Yagil, R., O Zagorski., C Van Creveld. et A Saran. 1994. "Science and camel's milk production." In *Actes du Colloque: Dromadaires et chameaux animaux laitier*.
- Yagil, Reuven. et Zipora Etzion. 1980. 'Effect of drought condition on the quality of camel milk', *Journal of Dairy Research*, 47: 159-66.
- Yamamoto, Nami., Nobuki Yamamoto., Hidehito Amemiya., Yoichi Yokomori., Kenichi Shimizu. et Akira Totsuka. 1991. 'Electrophoretic karyotypes of wine yeasts', *American Journal of Enology Viticulture*, 42: 358-63.

- Yamamoto, Naoyuki 1997. 'Antihypertensive peptides derived from food proteins', *Peptide Science*, 43: 129-34.
- Yamina, Merzouk., Chahrour Wassila., Zarour Kenza., Zergui Amina., Saidi Nouredine., Henni Jamal Eddine. et Kihal Mebrouk. 2013. 'Physico-chemical and microbiological analysis of Algerian raw camel's milk and identification of predominating thermophilic lactic acid bacteria', *Journal of Food science Engineering*, 3: 55.
- Yasmin, Iqra., Muhammad Saeed., Wahab Ali Khan., Adnan Khaliq., Muhammad Farhan Jahangir Chughtai., Rabia Iqbal., Saima Tehseen., Saima Naz., Atif Liaqat. et Tariq Mehmood. 2020. 'In vitro Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk', *Microorganisms*, 8: 354.
- Young, TW. et M Yagiu. 1978. 'A comparison of the killer character in different yeasts and its classification', *Antonie van Leeuwenhoek*, 44: 59-77.
- Yvon, Mireille. et Liesbeth Rijnen. 2001. 'Cheese flavour formation by amino acid catabolism', *International Dairy Journal*, 11: 185-201.
- Zarour, Kenza., Alicia Prieto., Adrián Pérez-Ramos., Mebrouk Kihal. et Paloma López. 2018. 'Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *L. mesenteroides* strains isolated from dairy and non-dairy products', *Journal of Functional Foods*, 49: 351-61.
- Zhang, H., J Yao., D Zhao., H Liu., J Li. et M Guo. 2005. 'Changes in chemical composition of Alxa bactrian camel milk during lactation', *Journal of dairy science*, 88: 3402-10.
- Zhao, Ying., Chi-Ching Tsang., Meng Xiao., Jasper FW Chan., Susanna KP Lau., Fanrong Kong., Yingchun Xu. et Patrick CY Woo. 2018. 'Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting', *Medical mycology*, 56: 816-27.