





# Remerciements

*Au nom du Dieu le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin, de nous avoir aidées tout au long de nos années d'étude.*

*Nous tenons à remercier M<sup>me</sup> SADOUN directrice du laboratoire de Microbiologie du Lait et Probiotiques de l'Université de Bejaia de nous avoir accueillies au sien du son laboratoire durant cette période de stage.*

*Nous remercions particulièrement notre promotrice, M<sup>me</sup> BENACHOUR, Pour le thème proposé. On vous remercie, madame on vous souhaite du succès et du bonheur*

*Nous tenons à remercier vivement M<sup>r</sup> SADOUN qui nous à fait un immense honneur de présider le jury.*

*Nos remerciements s'adressent également à M<sup>me</sup> FARADJI et M<sup>elle</sup> TITELI qui ont accepté d'examiner ce travail et de faire part de leurs remarques, reconnues judicieuses, qui ne feront que rehausser la qualité de ce mémoire.*

*A nos parents qui ont été toujours présent pour nous soutenir et nous encourager, qu'ils trouvent ici les résultats de leurs sacrifices.*

*Nous ne pourrions terminer, sans remercier toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie de Lait et Probiotique et tout particulièrement nos camarades pour leur soutien et leur esprit d'équipes, et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ou qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment.*

# Dédicaces

*A la mémoire de mon grand-père que Dieu l'accueille dans  
Son vaste paradis.*

*Aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents qui  
n'ont pas cessé de m'aimer et de m'encourager, sensible à  
leurs amour et leurs gentillesse, c'est avec émotion que je  
leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon  
profond respect.*

*A mes très chers sœurs et frères*

*A ma grand-mère*

*A mes grands parents paternels*

*A mes cousins et tantes et leurs familles*

*A mon binôme*

*A toutes mes amies*

*A tous ceux qui m'ont soutenue et épaulée*

**KAFIA**

# Dédicaces

*A mes chers parents qui m'ont offert sans condition leurs soutiens moral et financier, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance. , à vous, chers maman et papa toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.*

*A mes deux chers frères Hocine et Aimad que j'aime tant !*

*A toute ma famille*

*A mes adorables amies, Sousna, Kahina, Tiziri et Katia .*

*Notre amitié a fait naître un sentiment de fraternité incontournable et indestructible.*

*A Mehdi, qui m'as soutenu moralement, et qui m'as encouragé tout au long de mon travail, en me donnant la force et la confiance pour l'achever avec progrès et succès.*

*A mon binôme, chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.*

*A tous mes amis.*

*A tous ceux qui m'ont soutenue et épaulée*

**LOUBNA**

# Liste des abréviations

**ADN.** Acide DésoxyriboNucléique

**A<sub>w</sub>.** Activity water

**C.** Cytosine

**CO<sub>2</sub>.** Dioxide de carbone

**FAME.** Fat Acid Modified Enzyme

**FTAM.** Flore totale aerobie mésophile

**GN.**Gélose nutritive

**GRAS.** Generally recognized As Safe

**g.** gramme

**G.** guanine

**GC.** Giolitti et Cantoni

**h.**heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Peroxyde d'hydrogène

**Kg.** Kilogramme

***L.plantarum.*** *Lactobacillus plantarum*

***Lc.lactis.*** *Lactococcus lactis*

**MH.** Mueller-Hinton

**ml.** millilitre

**Mpb.** Miga paire de base

**MRS.** Man Rogosa Sharp

**Nacl.**chlorure de sodium

**NaOH.**hydroxyde de sodium

**pH.** Potentiel d'hydrogène

***S.aureus.*** *Staphylococcus aureus*

**SS.** *Salmonella Shigella*

**TIA.** Toxi-infection alimentaire

**TIAC.** Toxi-infection alimentaire collective

**VRBG.** Violet Rouge Bile Glucosé

**UFC.** Unité formant colonie

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Observation au microscope électronique de <i>S. aureus</i> .....	5
<b>Figure 2</b> : Revivification et vérification de la pureté des souches de <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. plantarum</i> .....	16
<b>Figure 3</b> : Revivification et vérification de la pureté de <i>S. aureus</i> .....	16
<b>Figure 4</b> : Standardisation des inocula de <i>Lc. lactis</i> et de <i>Lb. plantarum</i> .....	17
<b>Figure 5</b> : Standardisation des inocula de <i>S. aureus</i> .....	18
<b>Figure 6</b> : Test des spots.....	19
<b>Figure 7</b> : Cinétique de croissance de <i>Lc. Lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> et <i>S.aureus</i> dans le lait.....	22
<b>Figure 8</b> : Cinétique de croissance et d'acidité des souches dans le lactosérum.....	23
<b>Figure 9</b> : Test de réductase.....	24
<b>Figure 10</b> : Procédé de mis au point d'un fromage frais au lait de chèvre.....	28
<b>Figure 11</b> : Dénombrement de <i>S. aureus</i> dans le fromage.....	29
<b>Figure 12</b> : Zones d'inhibition de test des spots.....	31
<b>Figure 13</b> : Antibiogrammes des souches de <i>S. aureus</i> , <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. plantarum</i> .....	32
<b>Figure 14</b> : Evolution du pH du lait de chèvre stérile ensemencé avec les souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> et <i>S. aureus</i> .....	33
<b>Figure 15</b> : Evolution de l'acidité dornic du lait de chèvre stérile ensemencé avec les souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> et <i>S. aureus</i> .....	34
<b>Figure 16</b> : Evolution de la croissance de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> + <i>Lb plantarum</i> et <i>S.aureus</i> dans le lait de chèvre stérile.....	35
<b>Figure 17</b> : Evolution du pH dans le lactosérum stérile ensemencé avec les souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> et <i>S.aureus</i> .....	36
<b>Figure 18</b> : Evolution de l'acidité Dornic dans le lactosérum stérile ensemencé avec les souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> et <i>S.aureus</i> .....	37
<b>Figure 19</b> : Evolution de la croissance des souches de <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> et <i>S. aureus</i> ensemencé dans le lactosérum.....	37
<b>Figure 20</b> : Résultats de l'analyse microbiologique du lait.....	39
<b>Figure 21</b> : Fromage au lait cru ou stérile de chèvre conservé ou non dans le lactosérum.....	41
<b>Figure 22</b> : Evolution de <i>S. aureus</i> dans les fromages frais de chèvre au lait stérilisé.....	42
<b>Figure 23</b> : Evolution de <i>S.aureus</i> dans les fromages frais de chèvre au lait cru.....	42

<b>Figure 24 :</b> Evolution de <i>S. aureus</i> dans les fromages frais au lait stérilisé conservé dans le lactosérum.....	44
<b>Figure 25 :</b> Evolution de <i>S. aureus</i> dans le fromage frais au lait cru conservé dans le lactosérum.....	44

# Liste des tableaux en annexes

## Annexe I. composition des milieux de culture

**Tableau I** : Bouillon nutritif

**Tableau II** : Gélose Chapman

**Tableau III** : Eaux physiologique

**Tableau IV** : Gélose EMB

**Tableau V** : Milieu de Giolitti et Cantoni

**Tableau VI** : Milieu MRS

**Tableau VII** : Gélose Mueller-Hinton

**Tableau VIII** : Gélose SS

**Tableau IX** : Violet Red Bile Glucose Agar (gélose VRBG).

## Annexe II. Résultats

**Tableau I** : pH des laitsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

**Tableau II** : Acidité Dornic des laitsensemencés avec les des souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

**Tableau III** : Croissance des souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus* dans le lait stérile de chèvre

**Tableau IV** : Croissance des souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus* dans le lactosérum.

**Tableau V** : pH des lactosérumsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

**Tableau VI** : Acidité Dornic des laitsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

**Tableau VII:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage au de lait de chèvre stérile non conservé dans le lactosérum

**Tableau VIII:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage au lait cru de chèvre non conservé dans le lactosérum

**Tableau IX:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage frais au lait cru de chèvre conservé dans le lactosérum

**Tableau X:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage frais au lait stérilisé de chèvre conservé dans le lactosérum

**Tableau XI :** Résultats de l'analyse microbiologique du lait (UFC/ ml).

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques.....	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. Taxonomie et classification .....	4
I.3. Habitat.....	4
I.4. Genre <i>Lactobacillus</i> .....	4
I.5. Genre <i>Lactococcus</i> .....	5
II. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
II.1. Historique.....	7
II.2. Classification et taxonomie.....	7
II.3. Caractéristiques générales.....	7
II.4. Toxicité de <i>S. aureus</i> .....	9
II.5. Les toxi-infections alimentaires.....	10
III. Les fromages frais au lait cru de chèvre.....	11
III.1. Lait de chèvre.....	11
III.1.1. Définition.....	11
III.1.2. Composition du lait de chèvre.....	11
III.2. Le fromage frais de chèvre .....	12
III.2.1. Définition .....	12
III.2.2. Valeur nutritionnelle .....	13
IV. Lactosérum.....	13
IV.1. Généralités .....	13
IV.2. Différents types de lactosérum.....	14
IV.3. Composition du lactosérum.....	14

## Matériel et Méthodes

I. Objectif du travail.....	15
I.1. Souches utilisées.....	15
I.2. Revivification et vérification de la pureté des souches de <i>Lc lactis</i> , <i>Lb.plantarum</i> et la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
II. Standardisation des inoculas bactériens.....	16

II.1. préparation de l'inoculum standard de <i>Lc. lactis</i> et de <i>Lb. plantarum</i> .....	17
II.2. Préparation de l'inoculum standard de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
III. Recherche de l'activité antibactérienne des souches de <i>Lc.lactis</i> et <i>Lb.plantarum</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> par le test des spots.....	19
IV. AntibioGramme des souches de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> et la souche de <i>S.aureus</i> .....	20
V. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lait et le lactosérum.....	21
V.1. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lait.....	21
V.2. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lactosérum.....	22
V.2.1.Méthode de mesure du pH.....	23
V.2.2.Méthode de mesure de l'acidité Dornic.....	24
VI. Mise au point de fromage frais de chèvre.....	24
VI.1. Origine du lait.....	24
VI.2. Analyses effectuées.....	24
VI.2.1. Test d'ébullition.....	24
VI.2.2. Estimation de l'activité microbienne (test de la réductase).....	24
VI.2.3.Mesure du pH et l'acidité Dornic .....	25
VI.2.4. Analyses microbiologiques du lait.....	25
VI.3. Fabrication de fromage frais.....	26
VI.3.1.Préparation des préferments.....	26
VI.3.2. Préparation du lait.....	26
VI.3.3.Ensemencement.....	26
VI.3.4. Emprésurage.....	27
VII. Etude de l'évolution de la croissance de <i>S. aureus</i> dans les fromages frais.....	29

## **Résultats et discussion**

I. Vérification de la pureté des souches.....	30
II. Standardisation des inocula bactériens.....	31
III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>Lc. lactis</i> et <i>Lb. plantarum</i> à l'égard de <i>S.aureus</i> par le test des spots.....	31
IV. AntibioGramme des souches de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> et <i>S.aureus</i> .....	32
V. Cinétique de croissance et l'acidification des souches dans le lait.....	34
V.1. Cinétique d'acidification dans le lait de chèvre stérile.....	34
V.2. Cinétique de croissance dans le lait de chèvre stérile des souches de <i>Lc.lactis</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> + <i>Lb. plantarum</i> et <i>S.aureus</i> .....	36

VI.3. Cinétique de croissance et l'acidification des souches dans le lactosérum.....	37
VI.4. Cinétique d'acidification des souches de <i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> + <i>Lb. plantarum</i> et <i>S.aureus</i> .....	38
VI.5. Cinétique de croissance des souches de <i>Lc.lactis</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Lc.lactis</i> + <i>Lb.plantarum</i> et <i>S.aureus</i> dans le lactoserum.....	38
VII. Mise au point d'un fromage frais de chèvre .....	39
VII.1 Evaluation de la qualité hygiénique du lait cru de chèvre.....	39
VII.1.2. Test d'ébullition.....	39
VII.1.3. Mesure du pH et titration de l'acidité Dornic.....	39
VII. 1.3. Test de réductase.....	39
VII.1.4. Analyse microbiologique du lait cru de chèvre.....	40
VIII. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de <i>Lc.lactis</i> et <i>Lb.plantarum</i> à l'égard du <i>S. aureus</i> dans le fromage de chèvre cru ou stérilisé conservé ou non dans le lactosérum.....	41
VII.2.1. Fromage frais au lait cru et stérile.....	41
VII.2.1. Fromage frais au lait cru et stérile non conservé dans le lactosérum.....	42
VII.2.2. Fromage frais au lait cru et stérile conservé dans le lactosérum.....	45
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.	
Annexes.	

# *Introduction*

## Introduction

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles sont partout dans la nature et se trouvent aussi dans le système digestif de l'Homme, considérées comme inoffensives pour l'Homme, elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations des produits alimentaires en améliorant ainsi leurs conservation (Mofradj et al, 2007).

Les fromages sont généralement produits à partir du lait cru, ce dernier peut toutefois contenir des bactéries pathogènes. Différentes bactéries peuvent alors être présentes : *Salmonelles*, *Listeria monocytogenes* et *S. aureus* (Pujol-Dupuy, 2004). Cette dernière est à l'origine d'une intoxication alimentaire qui est due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (Kérouanton et al, 2007).

Les lactocoques et les lactobacilles connues pour leurs capacité à produire lors de leurs croissances des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène ( $H_2O_2$ ) et des substances naturelles de nature protéique douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération sans modifier les propriétés organoleptiques du produit (Privat et Thonart, 2011).

En Algérie, un intérêt particulier a été donné aux bactéries lactiques locales dont assez de travaux sur ces bactéries des laits crus, ont été publiés (Karam, 1995 ; Zadi, 1998 ; Guessas et Kihal, 2004; Idoui, 2008). De même, des résultats de recherches sur la flore lactique du beurre traditionnel de vache, de brebis et de chamelle, ont été couronnés par des publications (Kacem et Karam, 2006 ; Idoui et Karam, 2008 ; Idoui et al, 2009). Cependant, peu de travaux ont été publiés sur la flore lactique de fromage de chèvre.

Pendant de nombreuses années, le lactosérum a été considéré comme un déchet encombrant, un sous-produit des fromageries et caséineries. Il constitue pour la flore de la panse un apport important de lactose, sucre rapidement fermentescible en acide lactique, lui-même très vite métabolisé, principalement en acide gras volatils, à condition que les microorganismes du rumen aient été adaptés à ce nouvel aliment (Sottiez, 1985).

L'objectif de notre travail consiste à :

Mettre en évidence le pouvoir antagoniste des souches *Lc. lactis* et *Lb.plantarum* en culture pure ou mixte à l'égard de la souche *S.aureus* dans le fromage de chèvre conservé dans le lactosérum, et cela après la mise au point des fromages de chèvre au lait cru ou stérile conservé ou non dans le lactosérum.

## *Synthèse bibliographique*

## I. Les bactéries lactiques

### I.1. Généralités

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX<sup>ème</sup> siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire (**Pilet et al. , 2005**).

Elles sont des Gram positif, anaérobies facultatives, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative et nitrate réductase négative. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Hogg, 2005**).

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit et al. , 2007**).

Les bactéries lactiques ont été utilisées pendant des siècles pour la fermentation des aliments et, par conséquent, de mieux les préserver. Considéré comme inoffensif pour l'Homme, leur utilisation s'est largement répandue dans l'industrie alimentaire. En effet, le développement des nouvelles technologies de biologie cellulaire ouvre des opportunités pour l'utilisation de ces bactéries comme agents bio-thérapeutiques. Ces espèces produisent des protéines hétérogènes tels que les enzymes (lipase, lactase, estérase), des médiateurs chimiques (hormones et interleukines) et des molécules capables de stimuler des réponses immunitaires locales (**Mofredj et al. , 2007**).

Elles permettent, par leur métabolisme, d'augmenter la durée de conservation d'origine des denrées et de leur conférer une saveur et une texture différente (**Badis et al. , 2005**). Ces bactéries ont la capacité de fermenter les sucres (glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose) en acide lactique, elles ne produisent pas de pseudo-catalase et possèdent un métabolisme anaérobie strict ou aéro-tolérant en raison de l'absence de chaîne respiratoire (**Makhloufi, 2011**). Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires, ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (**Dortu et Thonart, 2009**).

Les bactéries lactiques sont connues pour leur capacité à produire lors de leur croissance des composés actifs à savoir les acides organiques qui acidifient le milieu, des dérivés du métabolisme de l'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des substances naturelles de nature protéique

douées d'une activité antagoniste à l'encontre d'un grand nombre de germes d'altération et pathogènes, leur permettant de se développer préférentiellement dans divers écosystèmes. Parmi ces substances synthétisées, des peptides dénommés bactériocines. Elles présentent une activité bactéricide ou bactériostatique. Leur spectre d'activité peut être plus ou moins large, quelquefois limité aux espèces proches phylogénétiquement des bactéries productrices (**Allouche et al. , 2010**).

Leur ADN présente un pourcentage de G + C compris entre 30 et 60% et une taille de génome comprise entre 1,8 et 3,3 Mpb (**Makhloufi, 2011**).

Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie appartiennent principalement à trois genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ces trois genres microbiens se différencient particulièrement par leur température optimale de croissance et leur propriété acidifiante (**Drider et Préost, 2009**).

## **I.2. Taxonomie et classification**

La taxonomie des bactéries lactiques est pour longtemps basée sur leurs propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques (**Olaoye et al. , 2009**).

Actuellement on fait appel à des techniques génétiques et moléculaires. Plusieurs méthodes ont été également utilisées pour caractériser les bactéries lactiques telles que l'estimation du contenu en GC%, l'hybridation ADN /ADN, et le séquençage de l'ARNr 16 S (**Ukeyima, 2010**).

## **I.3. Habitat**

Les bactéries lactiques sont ubiquistes très fréquentes dans la nature. Elles se retrouvent dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène. Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Makhloufi, 2011**).

## **I.4. Genre Lactobacillus**

Les lactobacilles sont des cellules allongées, régulières en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaînettes, de taille variable, asporulées, immobiles ou mobiles grâce à des flagelles péritriches, anaérobies facultatifs. Leurs exigences nutritionnelles (source de carbones, d'azote, vitamines ...) et leurs températures de croissance sont très variables d'une espèce à l'autre dont le maximum peut atteindre 53- 55°C, leurs pH optimal de

croissance est entre 5,5 et 6,2. Leurs pourcentages en GC sont de 36 à 47 (**de Roissart et Luquet 1994 ; Drider et Préost ,2009**).

Les lactobacilles sont largement utilisés dans l'alimentation et l'industrie pharmaceutique en raison de leurs propriétés bénéfiques (**Ghobadi et al, 2010**).

Leur mode de fermentation donne lieu à une classification répartie en trois groupes distincts :

➤ **Le groupe I:** regroupe les lactobacilles homofermentaires stricts qui ne fermentent que les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof en produisant exclusivement du lactate. Ce groupe comprend notamment *Lb. acidophilus*, *Lb. farciminis*, *Lb. johnsonii*, *Lb. amylovorus*, *Lb. paralimentarius*, *Lb. Delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. nantensis* ;

➤ **Le groupe II:** renferme les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses, mais aussi les pentoses en lactate et acétate par la voie d'Embden-Meyerhof. Il s'agit en particulier de *Lb. alimentarius*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. graminis*, *Lb. paracasei*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. sakei*. Ces espèces bactériennes sont présentes dans les végétaux fermentés comme l'ensilage et dans les produits carnés et laitiers fermentés ;

➤ **Le groupe III:** regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub>. Les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate. Ces Lactobacilles ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques. Il s'agit notamment de *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fructivorans*, *Lb. panis*, *Lb. pontis*, *Lb. reuteri*, *Lb. hammesii*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. spicheri*, *Lb. Kimchii* et *Lb. Frumenti* (**Privat et Thonart, 2011**).

#### ❖ *Lb. plantarum*

*Lb. plantarum* est une bactérie à Gram positif, non pathogène, qui se trouve fréquemment, spontanément et en grand nombre dans les aliments fermentés, particulièrement d'origine végétale (**Droualt et Corthier, 2001**). Elle a une capacité saisissante de fermenter de différents hydrates de carbone. Elle peut posséder l'activité de tannase et peuvent également métaboliser les acides phénoliques (**Göran Molin, 2006**).

### **I.5. Genre Lactococcus**

Les lactocoques sont des bactéries en forme de coques, en paire ou en courtes chaînes. Elles présentent un métabolisme homofermentaire facultatives c'est-à-dire qu'elles consomment les sucres par la voie glycolytique en produisant exclusivement l'acide lactique sous sa forme L+. Cependant, certaines espèces sont capables, dans certaines conditions de pH, de source carbonées disponibles, de cultures (aérobie/anaérobie, carences nutritionnelle

...) d'utiliser une voie hétérofermentaire via la voie des pentoses phosphates (**Dridier et Préost, 2009**).

Les lactocoques sont très majoritairement mésophiles, leur température optimale de croissance est 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

#### ❖ *Lc. lactis*

L'espèce *Lc. lactis* est isolée pour la première fois à partir du lait fermenté par Lister en 1873 et reconnue comme un agent primaire de l'acidification du lait caillé (**Bekhouche, 2006**). Elle est utilisée comme modèle pour la recherche fondamentale (première bactérie lactique dont le génome a entièrement été séquencé), et également la seule espèce de son genre microbien à être volontairement utilisée en fromagerie.

Cette bactérie acidifie assez lentement mais permet en revanche des abaissements de pH autour de 4,2. L'auxotrophie est une caractéristique spécifique pour compenser cette limitation, elle possède une protéase, portée par un plasmide, lui permettant une utilisation optimisée des peptides du milieu dans lequel elle croît (oligopeptide) (**Dridier et Préost, 2009**).

## II. *Staphylococcus aureus*

### II.1 Historique

Jusqu'en 1870, les staphylocoques étaient connus comme étant la cause des inflammations de la peau, ce n'est qu'en 1884 qu'ils ont été associés aux intoxications alimentaires, lorsque Vaughan et Sternbeg ont isolé le germe d'un cheddar lié à 300 cas d'intoxication alimentaire dans le Michigan. En 1954, la relation entre les empoisonnements alimentaires à *Staphylococcus aureus* et la production de toxines a été établie par Baber (**Elliot, 2001**).

### II.2 Classification et taxonomie

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des bacilli, ordre des Bacillales, famille des staphylococcaceae (**Bergey's manuel, 2007**).

Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes selon leur aptitude à produire une coagulase. Actuellement sept espèces de ce genre sont coagulase positive *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi subsp. Coagulans*, *S. delphini*, *S. hycus*, *S. aureus subsp. aureus* et *S. aureus subsp. aneroobius* (**Taponen et Pyorala, 2008**).

### II.3. Caractéristiques générales

*S. aureus* est une bactérie Gram positif de 1µm de diamètre, donnant des colonies jaune-doré caractéristiques due à la production de pigments caroténoïdes. A l'examen microscopique, elle apparaît sous forme de petites cocci en paires, petites chaînettes ou en amas donnant l'aspect de grappes (figure 1), sa paroi cellulaire est formée de trois constituants majeurs : le peptidoglycane composé d'unités répétitives de N-acetylglucosamine β-1-4 liées à l'acide N-acétylmuramique, des acides téchoïques au ribitol liés via des N-acétylmanosaminyl β1-4-N-acetylglucosamine au muramyl-6-phosphate, et la protéine A, liée au peptidoglycane par liaison covalente (Bhunja, 2008).



**Figure 1** : Observation au microscope électronique de *S. aureus* (Agnès, 2013).

*S. aureus* ne forme pas de spores et peut donc être facilement éliminé par traitement thermique. Cependant, dans les cas de fabrication de produits à partir de lait cru ou de cas de contaminations postérieures au traitement thermique, cette caractéristique ne permet pas de s'affranchir du risque lié à *S. aureus*.

*S. aureus* est une bactérie anaérobie facultative, mésophile, neutrophile et halophile. Son optimum de croissance se situe à une température d'environ 37°C avec un pH compris entre 6 et 7, mais elle est capable de se développer à des températures comprises entre 7 et 48°C et à des pH compris entre 4 et 10 (Charlier *et al.*, 2009)

La croissance de *S. aureus* est possible dans des milieux présentant une activité de l'eau (AW) très faible (0,83), avec un optimum quand l'AW est supérieure à 0,99 (Bennett, 2001). La bactérie est aussi capable de supporter des concentrations en chlorure de sodium allant jusqu'à 20 % (Charlier *et al.*, 2009).

Les bonnes capacités d'adaptation évoquées précédemment permettent à *S. aureus* de coloniser la peau et les muqueuses des êtres humains et des animaux. Il a aussi été montré que *S. aureus* était capable de survivre, entre autres, dans la poussière, sur les tissus, sur le verre ou les surfaces vitrées ainsi que sur les sols (Todd et al., 2009). Et comme en témoignent les nombreux aliments impliqués dans des cas de TIAC par *S. aureus*, la bactérie se développe et produit des toxines entre autres sur les viandes, dans des produits de charcuterie, les préparations à base d'œufs et les produits laitiers. *S. aureus* est responsable ou suspecté dans 68% des cas de TIAC par les produits Laitiers (Delmas et al., 2006).

#### II.4. Toxicité de *S. aureus*

*S. aureus* peut être la cause de différentes infections chez l'Homme. Il est impliqué dans les infections cutanées plus ou moins localisées. Il est responsable d'infections nosocomiales (Grundmann et al, 2002), et sa résistance aux antibiotiques en particulier à la méthicilline est une préoccupation majeure. Sa virulence est liée à la production d'enzymes (tableau I), de toxines, à la présence de protéines de surface, de protéines de liaison au fibrinogène et sa capacité à former des biofilms par production d'exopolysaccharide (Fox et al, 2005 ; Oliveira et al., 2006).

**Tableau I** : les facteurs de virulence de *staphylococcus aureus* (Novick, 2003).

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Propriété et fonction</b>
<b>Toxines</b>	
Hémolysine $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Action sur la membrane cellulaire. Effet cytotoxique et/ou cytolytique.
Leucocidine panton-valentin	Action lytique sur les leucocytes, induction de nécrose cellulaire.
Exfoliative A et B	Epidermolyse, activité mitogène sur les lymphocytes T, responsable de staphylococcies cutanées bulleuses.
Toxine du syndrome du choc toxique (TSST)	Activité superantigénique, responsable du syndrome du choc toxique.
Entérotoxines A-E (SEA- SEE)	Activité superantigénique et émétique ; impliquées dans les intoxications alimentaires.

Suite au tableau I : les facteurs de virulence de *staphylococcus aureus* (Novick, 2003).

<b>Enzymes</b>	
Coagulase libre	Coagulation du plasma, rôle protecteur contre la phagocytose.
Enzymes modifiant les acides gras (FAME)	Estérification des acides gras.
Lipase /estérase	Hydrolyse des lipides, rôle nutritionnel.
Staphylokinase	Active le plasminogène en plasmine et provoque la lyse de la fibrine.
Nucléases	5'phosphodiesterase exo et endonucléase active sur les acides nucléiques, rôle nutritionnel.
Hyaluronidase	Lyse des tissus conjonctifs ; diffusion tissulaire de <i>S. aureus</i> .
PI-phospholipase C	
Cystéine protéase	
Composés de surfaces	
Protéine A	Fixe le fragment Fc des immunoglobulines ; résistance à la phagocytose.
Fibronectine binding protein A et B	Liaison à la fibronectine ; adhésion et colonisation.
Protéine de liaison au fibrinogène	Fixation au fibrinogène ; adhésion et colonisation
Protéine de liaison au collagène	Fixation au collagène ; colonisation.
Cumping factors A et B	Fixation au fibrinogène ; colonisation.
Polysaccharide de capsule	Lutte contre la phagocytose.

## II.5. Les toxi-infections alimentaires

La toxi-infection alimentaire staphylococcique (TIA) est une intoxication due à l'ingestion d'une ou de plusieurs entérotoxines produites dans un aliment contaminé par un staphylocoque (**Kérouanton et al ., 2007**). La dose infectieuse d'enterotoxine-staphylococcique est d'environ 1ng / g de nourriture, ce taux est atteint lorsque la population de *S. aureus* excède les  $10^5$  cellules/ g. La concentration d'enterotoxine SEA requise pour provoquer une TIA chez l'être humain est de 200ng/ kg. SEB est également très toxique, une dose de 0,4µg/kg est susceptible de provoquer un choc toxique chez l'humain (**Bhunia, 2008**).

Les fromages ne sont pas épargnés par ce type de contamination. Récemment, la caractérisation de 33 souches de *S. aureus* isolées de 31 cas de TIA recensées entre 1981 et 2002 en France et impliquant aussi bien des aliments cuisinés que des fromages a mis en évidence que 31 de ces souches étaient d'origine humaine (biotype humain) (**Kerouanton et al ., 2007**), mettant ainsi en cause le personnel ayant manipulé ces aliments. De récents rapports de TIA au Japon ou au Brésil incriminent le personnel des usines de conditionnement de lait et de production de lait en poudre ou de fromages dans la contamination (**Asao et al ., 2003**). Bien que la source de contamination des aliments par un pathogène soit le plus souvent humaine, le lait cru peut aussi être un vecteur de pathogène dans des cas de TIAC impliquant des produits laitiers.

## III.Fromage frais au lait cru de chèvre

### III.1 Lait de chèvre

#### III.1.1 Définition

D'après le congrès international de la répression des fraudes qui s'est tenu en 1909, le lait est défini comme suit « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière, bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». Certaines propriétés du lait de chèvre sont connues pour être avantageux par rapport à ceux du lait de vache, soit pour certaines intolérances au lait de vache chez les jeunes enfants et nourrissons soit pour sa meilleure digestibilité, ou dans l'alimentation des personnes âgées . Le lait de chèvre ne contient pas de  $\beta$  carotène ce qui lui confère sa couleur blanchâtre mate avec une odeur assez neutre dite caprine. Il a une saveur douçâtre, agréable et sans grumeaux (**Melo et al ., 2013**).

### III.1.2 Composition du lait de chèvre

Tout comme tous les laits, le lait de chèvre est un liquide blanc composé de lipides en émulsion sous forme de globules, des caséines en suspension colloïdales, de protéines du sérum en solution colloïdale, de lactose et des minéraux en solution (tableau I).

**Tableau II:** Composition du lait cru de chèvre en comparaison avec le lait de vache (pour 100g du lait) (Agnihotri et Prasad, 1993).

<b>Composition</b>	<b>Lait de chèvre</b>	<b>Lait de vache</b>
<b>Eau (%)</b>	86,8	87,5
<b>Energie (%)</b>	72	67
<b>Protéine (%)</b>	3,3	3,2
<b>Matière grasse (%)</b>	4,5	4,1
<b>Glucides (%)</b>	4,6	4,4
<b>Minéraux (%)</b>	0,8	0,8
<b>Calcium (mg)</b>	170	120
<b>Phosphore (mg)</b>	120	90
<b>Sodium (mg)</b>	11	16
<b>Potassium (mg)</b>	110	140
<b>Fer (mg)</b>	0,3	0,2
<b>Vitamine A (UI)</b>	182	174
<b>Vitamine C (mg)</b>	1,0	2,0
<b>Thiamine (B<sub>1</sub>) (µg)</b>	50	50
<b>Riboflavine (B<sub>2</sub>) (µg)</b>	40	190
<b>Niacine (B<sub>3</sub>) (µg)</b>	300	100
<b>Acide folique libre (B<sub>9</sub>) (µg)</b>	0,5	5,6
<b>Acide folique totale (µg)</b>	1,3	8,5
<b>Cobalamine (B<sub>12</sub>) (µg)</b>	0,05	0,14

## III.2 Fromage frais de chèvre

### III.2.1 Définition

La dénomination « fromage » est réservée, selon le décret n° 88-1206 du 30 décembre 1988, au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir de matières d'origine exclusivement laitière (lait, lait entier, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre), utilisées seules ou en mélange, et coagulées en totalité ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de leur eau (**Rousseau, 2007**).

Le mot fromage vient du latin *formaticums* signifiant qu'il est fabriqué dans une forme appelée moule ou *forma* (**Rousseau, 2007**).

Les fromages constituent d'excellentes sources de calcium. Toutefois le taux de calcium varie en fonction de la teneur en eau et du mode de fabrication (**Dillon et Berthier, 2006**).

La saveur caractéristique des fromages au lait de chèvre est principalement due à composés volatils. En outre, l'utilisation du lait cru dans le processus de fabrication améliore les volatiles dans le fromage (**Delgado et al ., 2011**).

### III.2.2. Valeur nutritionnelle

Les fromages de chèvre en particulier offrent non seulement une grande diversité de formes, de textures et de goûts, mais aussi des qualités nutritionnelles et santé, ils participent au bon équilibre de notre alimentation (tableau III).

**Tableau III** : Valeurs nutritionnelles pour une portion de 100 g (**Millward, 2012**).

Composants	Quantité
Valeurs énergétiques	268 kCals
Eau	60.75 g
Protéines	18.52 g
Glucides	0.89 g
Lipides	21.08 g
cendres	1.58 g
Calcium	140 mg
Vitamine B12	0,19 µg
Vitamine A	54 µg

## IV. Lactosérum

### IV.1. Généralités

Découvert il y a environ 3000 ans. En plus d'être apprécié comme agent médicinal dans le 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> siècle, le lactosérum a été principalement considéré comme un déchet de l'industrie laitière, et donc destinée à la gouttière moins chère. Dans la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, la réglementation empêche l'élimination du lactosérum non traité. Dans le même temps, la reconnaissance de la valeur des composantes du lactosérum est accélérée. La science moderne a démêlé les secrets des protéines de lactosérum, et elle a établi une base solide pour leur valeur nutritionnelle et fonctionnelle. En parallèle, les progrès technologiques à exploiter cette connaissance fondamentale, qui se manifeste comme avancés de traitement de lactosérum régimes. Ces progrès se sont poursuivis dans le début du 21e siècle en mettant l'accent plus sur la fonctionnalité biologique des composantes du lactosérum (**Smithers, 2008**).

### IV.2 Différents types de lactosérum

Le lactosérum constitué essentiellement d'eau, contient du lactose, des protéines des minéraux et un peu de matière grasse. La quantité et la proportion relative de ces différents constituants dépendant entre des procédés d'obtention.

Ces lactosérums peuvent être classés en deux principales catégories selon l'acidité du liquide obtenu :

➤ **Lactosérums doux** : dont l'acidité varie entre 15 et 22°Doronic (pH =6,3). Ils sont issus de la production de pâtes pressées et/ou cuites.

➤ **Lactosérums acides** : obtenus lors de la fabrication des pâtes fraîches et molles ou lors de production des caséines, atteignent 120°Doronic soit un pH proche de 4,5 (**Schuck et al., 2004**).

### IV.3 Composition du lactosérum

Le lactosérum issu de la transformation du lait de chèvre est principalement du lactosérum acide (pH 4,3 – 4,7), dont la composition est donnée dans le tableau IV.

**Tableau VI** : Composition du lactosérum caprin acide (g/kg) (Cayot et Lorient, 1998).

<b>Composants</b>	<b>Quantité</b>
Extrait sec	58 - 68
Lactose	35 - 40
Matières grasses	0,3 - 2,8
Protéines dont :	6 - 9
Béta LG	2,4 - 3,6
Alpha LA	1,6 - 2,6
Immunoglobulines (IgG)	0,5 - 0,9
SA	0,6 - 0,8
caséines	0,2 - 1
Cendres : dont	5 - 7
Calcium	1 - 1,5
Phosphore	0,7 - 0,9

## *Matériel et Méthodes*

## I. Objectif du travail

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Appliquée équipe de Microbiologie du Lait et Probiotiques de l'Université de Bejaia, durant la période Février – mai de l'année 2013.

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

- Tester l'activité antibactérienne des souches lactiques choisies contre le *S.aureus*.
- Suivre la cinétique de croissance dans le lait stérile de chèvre des souches de *Lc.lactis*, *Lb. plantarum* et de *S. aureus*
- Fabrication du fromage frais de chèvre à base d'un lait cru et d'un lait stérile renfermant une concentration assez importante de *S. aureus*.
- Evaluation de l'activité antibactérienne à l'égard de *S. aureus* dans le fromage frais de chèvre conservé ou non dans le lactosérum.

### I.1. Souches utilisées

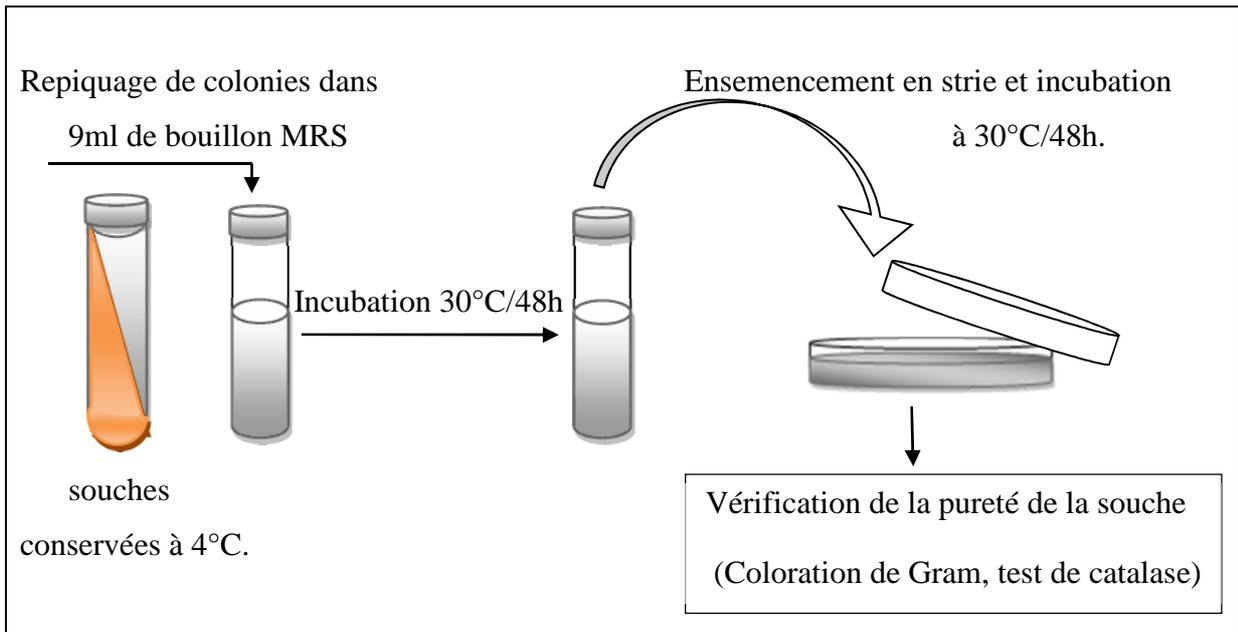
Trois souches de la collection des souches du Laboratoire de Microbiologie du Lait et Probiotiques sont utilisées dans cette étude.

- *Lactobacillus plantarum* isolée à partir des olives.
- *Lactococcus lactis* isolée à partir du lait de chèvre.
- *Staphylococcus aureus* isolée à partir du lait de vache.

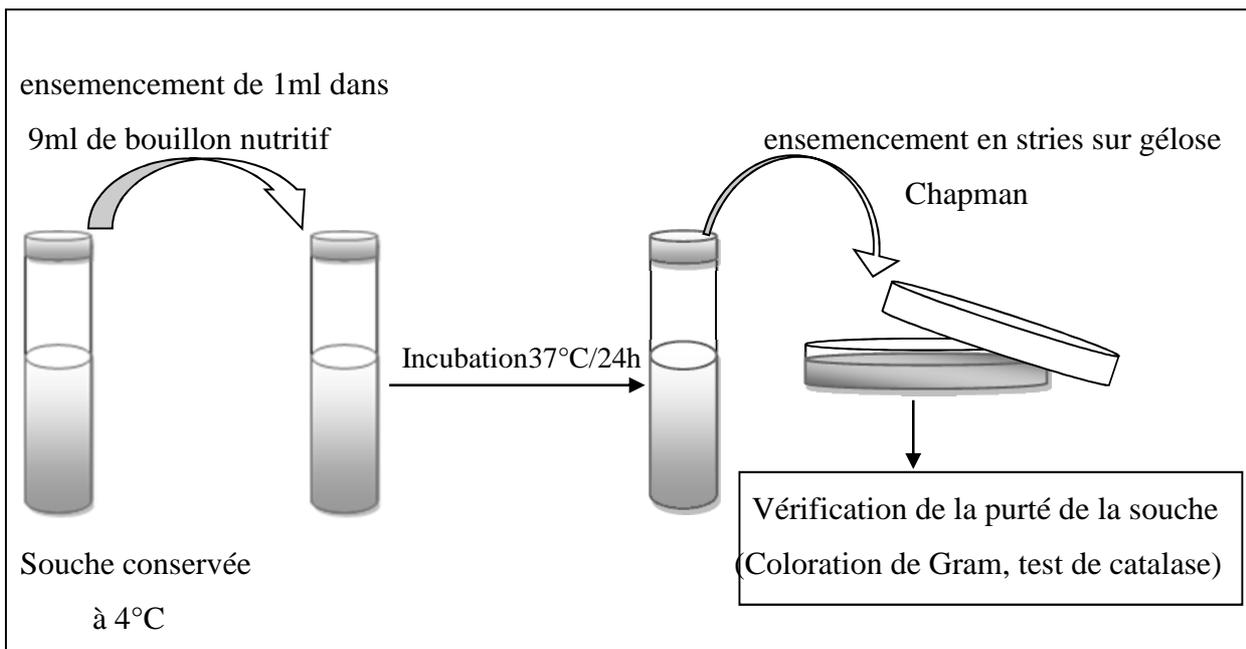
### I.2. Revivification et vérification de la pureté des souches de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* et la souche de *Staphylococcus aureus*

Deux souches de bactéries lactiques, *Lc.lactis* et *Lb.plantarum* conservés dans la gélose MRS à 4°C, sont repiquées sur bouillon MRS. En moyenne 3 à 4 repiquages successifs sont réalisés pour s'assurer de la pureté des souches. L'incubation est réalisée à 30°C/48h (Figure 2).

La souche de *Staphylococcus aureus* conservé dans le bouillon nutritif à 4°C, est repiquée sur le même milieu liquide puis incubée à 37°C pendant 24h tel que décrit sur la (figure 3).



**Figure 2 :** revivification et vérification de la pureté des souches de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.



**Figure 3 :** revivification et vérification de la pureté de *S. aureus*.

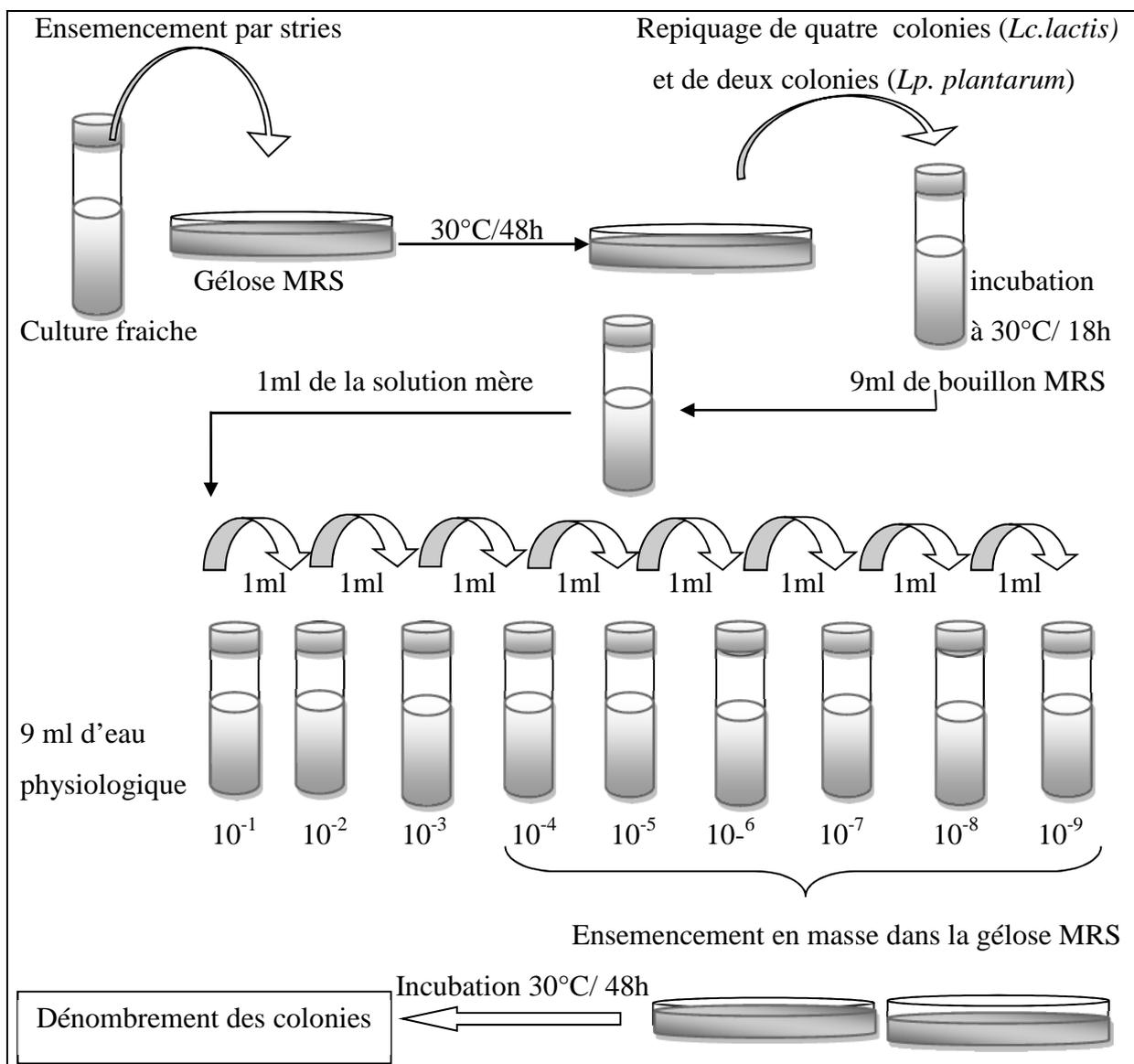
## II. Standardisation des inoculas bactériens

La standardisation a pour but d'avoir le même nombre de cellules bactériennes dans un ml de culture durant toute l'expérimentation.

L'activité des agents antimicrobien est dépendante de la densité de la suspension cellulaire de la souche cible utilisée (Leroy et De Vuyst, 2000).

## II.1. Préparation de l'inoculum standard de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*

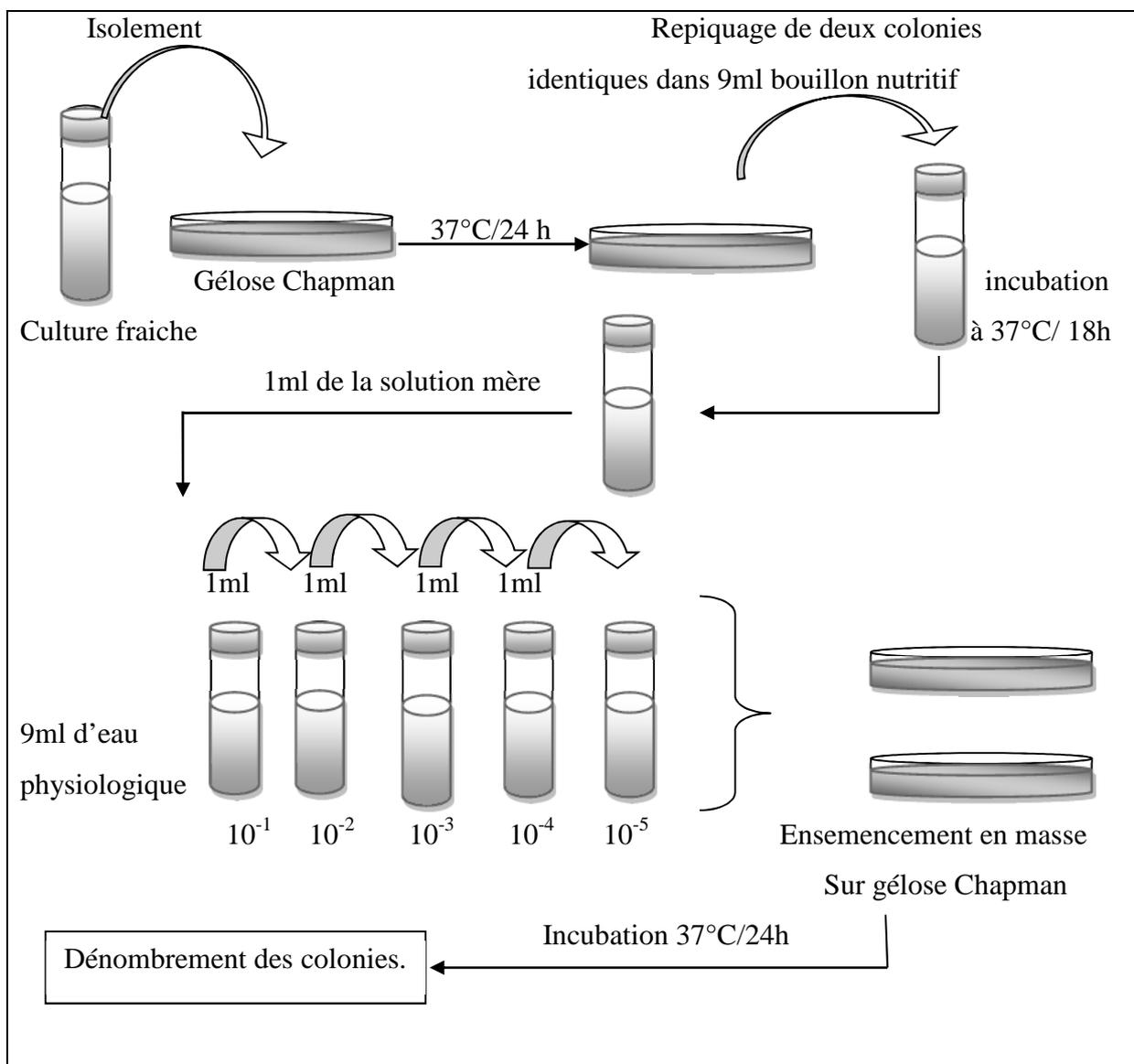
A partir des cultures fraîches de 18h, obtenues dans 9 ml du bouillon MRS, un ensemencement est réalisé sur gélose MRS. Après 48 h d'incubation à 30°C, quatre colonies de *Lc.lactis*, 2 colonies de *Lb.plantarum* bien isolées et bien distinctes sont repiquées dans un tube à essai de 9 ml de bouillon MRS, puis incubées à 30°C pendant 18h. Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ). A partir des dernières dilutions préparées ( $10^{-4}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1 ml de chaque dilution est ensemencé en masse dans une gélose MRS, puis incubé à 30°C pendant 48 h. Après 48 h les colonies sont dénombrées (Figure 3).



**Figure 4 :** Standardisation des inocula de *Lc. lactis* et de *Lb. plantarum*

## II.2. Préparation de l'inoculum standard de *Staphylococcus aureus*

A partir d'une culture fraîche, obtenue sur bouillon nutritif, un ensemencement par stries est réalisé sur milieu Chapman, après incubation à 37°C/24 h, deux colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et reprises dans un tube à essai contenant 9 ml de bouillon nutritif, puis incubé à 37°C pendant 18h . Après l'incubation, des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ ). A partir des dilutions préparées, 1 ml de chaque dilution est ensemencé en masse dans une gélose Chapman. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après l'incubation le dénombrement des colonies est réalisé (Figure 5).

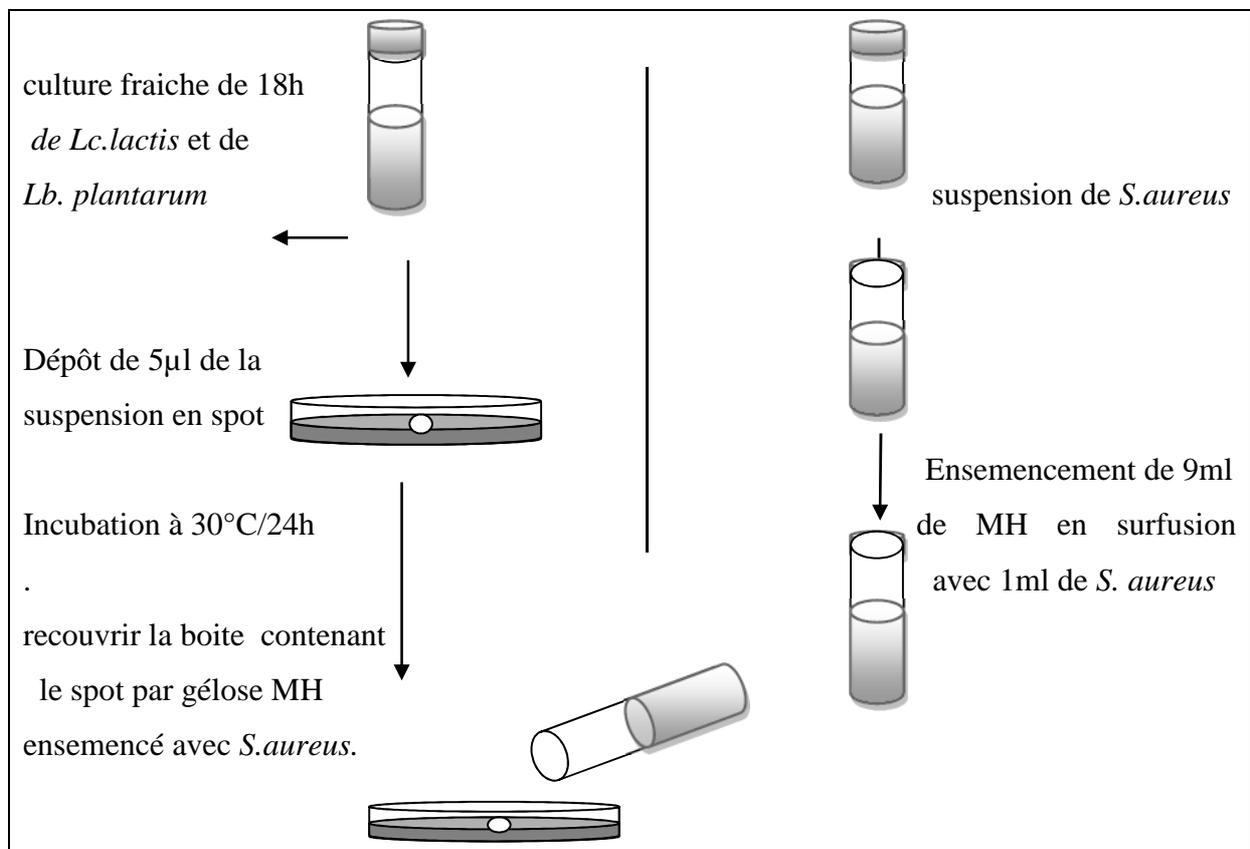


**Figure 5** : Standardisation des inocula de *S. aureus*.

### III. Recherche de l'activité antibactérienne des souches de *Lc.lactis* et *Lb.plantarum* à l'égard de *S.aureus* par le test des spots

Afin de mettre en évidence l'action antibactérienne de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus*, pour les utiliser comme ferment lactique, éventuellement comme des bioconservateur barrière pour ce germe dans des laits fermentés ou des fromages, le test des spots est réalisé.

L'activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques à l'égard de *S.aureus* est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots de **(Schillinger et Lucke, 1989)**. Après avoir coulé les boîtes de pétri avec la gélose MRS (solidifiée et séchée), 5µl de la suspension bactérienne de souche de bactéries lactiques (*Lc.lactis* et *Lb.plantarum*) sont déposés en spots. Les boîtes sont séchées à l'air ambiant pendant 30 min environ puis incubées à 30°C /18 h. Après la période d'incubation, les spots sont recouverts de 9 ml d'une gélose semi molle de MH en surfusion ensemencée avec 1ml d'une culture fraîche de souche *S. aureus* à  $10^7$ UFC /ml, puis incubées à 37°C pendant 24 h. Après cette période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (figure 6).



**Figure 6:** Test des spots

#### IV. Antibiogramme des souches de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et la souche de *S.aureus*

La détermination de la sensibilité des bactéries lactiques vis-à-vis des antibiotiques est fondée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition. La méthode des disques est utilisée dans cette étude.

Dans le but de rechercher une éventuelle résistance aux ATB de la souche de *S. aureus*, *Lc.lactis* et de *Lb.plantarum*. Des antibiogrammes standards sur gélose Mueller Hinton pour *S. aureus* et sur milieu MRS pour les bactéries lactiques ont été réalisés selon les recommandations du CA-SFM (2010). Une dilution décimale à  $10^{-1}$  est réalisée pour les trois souches.

##### IV.1. Ensemencement (CA-SFM, 2010)

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne à  $10^6$  UFC/ml pour *S. aureus* et à  $10^7$  UFC/ml pour les deux bactéries lactiques.

1. Essorer l'écouvillon en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
2. Sur des boîtes de Pétri présentant 4 mm d'épaisseur ont coulé de gélose MH pour *S.aureus* et d'une gélose MRS pour *Lc. Lactis* et *Lb.plantarum*, frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas en stries serrées
3. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de  $60^\circ$  à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même
4. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose
5. Déposer les disques d'antibiotique contenant une concentration donnée d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile. Après diffusion (30 min à température ambiante) l'incubation est à  $37^\circ\text{C}/24$  h pour *S. aureus* et à  $30^\circ\text{C}/24$  h pour les bactéries lactiques.

## IV.2. Lecture

Après incubation, on mesure avec précision le diamètre de la zone d'inhibition. L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) est effectuée selon la recommandation CA-SFM.

## V. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lait et le lactosérum

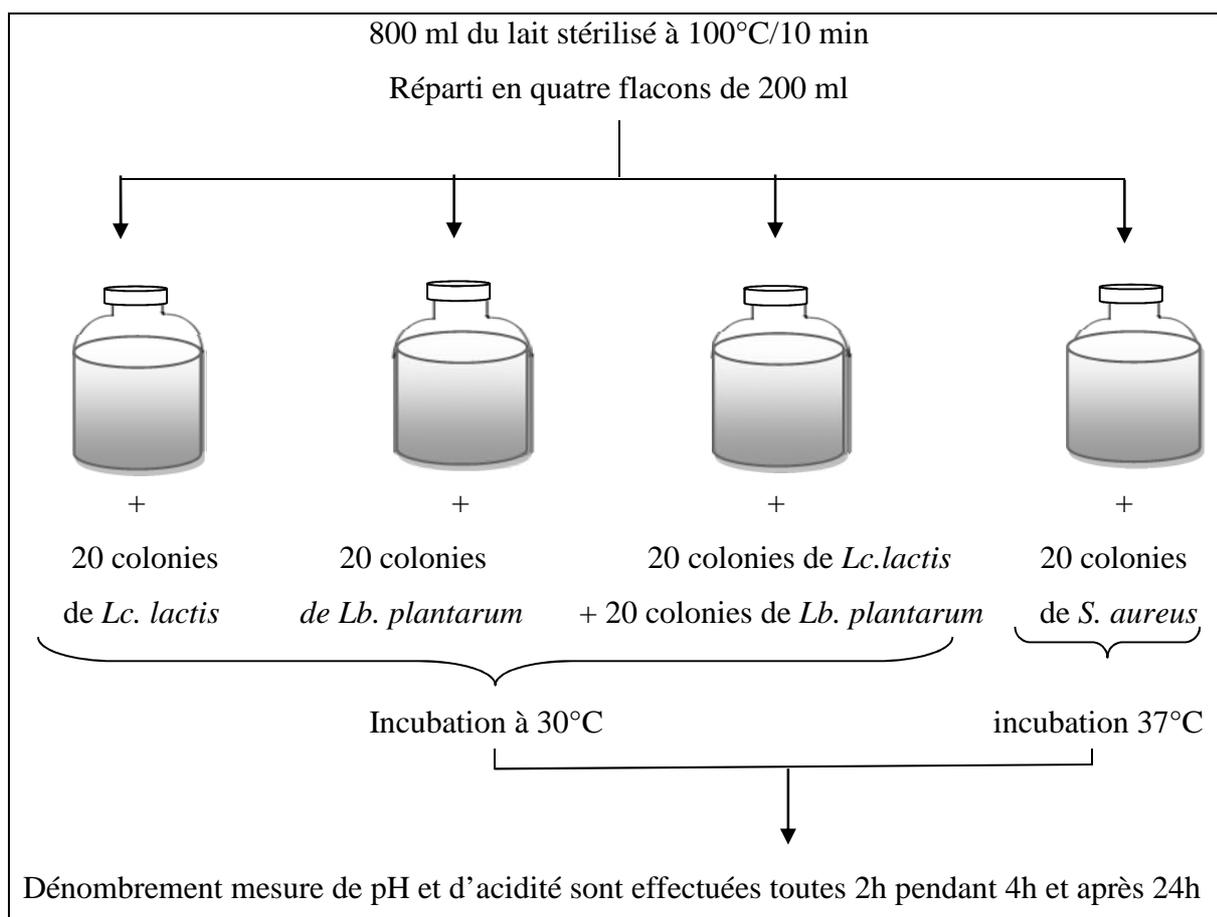
L'activité acidifiante des bactéries représente leur principale activité métabolique et qui dépend directement de leur croissance. La façon la plus indiquée pour la mesure de l'activité acidifiante consiste à suivre d'une part, l'évolution du pH des cultures pures au cours du temps et d'autre part à doser simultanément l'acidité Doronic par la soude NaOH N/9 (Gourgaude *et al.*, 1997), La mesure de croissance et le pouvoir acidifiant est réalisée dans du lait stérilisé et dans du lactosérum stérile.

### V.1. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lait de chèvre

Pour réaliser cette étude un volume de 800ml du lait de chèvre répartie en 4 flacons a raison de 200 ml est stérilisé à 100°C/10 min et on ensemence :

- 20 colonies isolées et bien distinctes de 48h à 30°C de *Lc. lactis* dans 200 ml du lait stérilisé;
- 20 colonies isolées et bien distinctes de 48h à 30°C de *Lb. plantarum* dans 200 ml du lait stérilisé;
- 20 colonies isolées et bien distinctes de 48h à 30°C de *Lc. lactis* plus 20 colonies de *Lb. plantarum* de 48 h à 30°C dans 200 ml du lait stérilisé;
- 20 colonies isolées et bien distinctes de 48h à 37°C de *S.aureus* dans 200 ml du lait stérilisé.

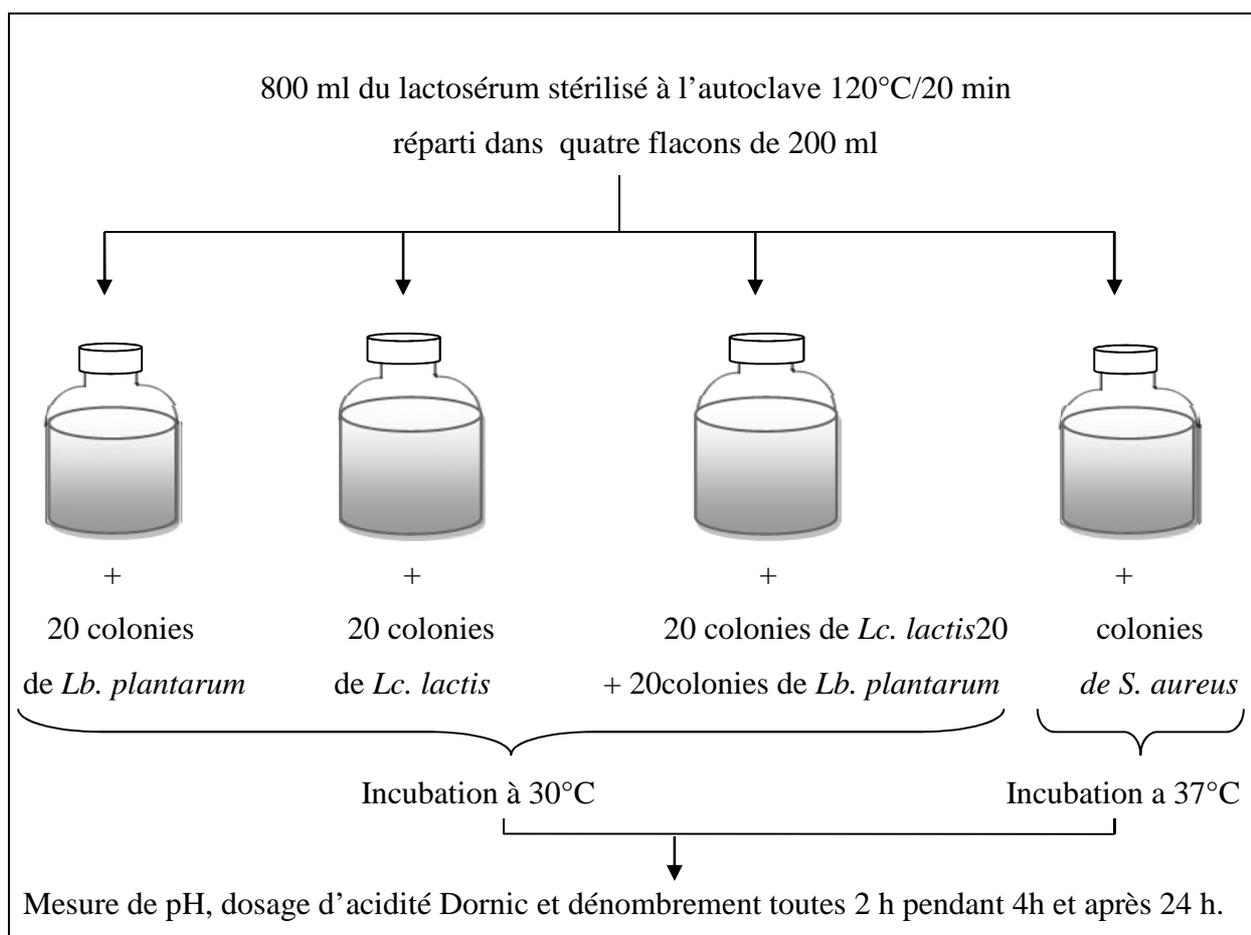
L'incubation est réalisée à 30°C. Les dénombrements, mesure de pH et dosage d'acidité sont réalisés à 0 h (moment de l'ensemencement à 2h à 4h et après 24h (figure7).



**Figure 7 :** Cinétique de croissance de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et *S.aureus* dans le lait

## V.2. Cinétique de croissance et d'acidification des souches dans le lactosérum

Il est intéressant de connaître l'évolution de la croissance de ces bactéries dans le lactosérum, afin de l'utiliser comme milieu de conservation des fromages frais de chèvre. Au laboratoire une quantité de 800 ml de lactosérum est répartie dans quatre flacons de 200 ml stérilisé à l'autoclave à 120°C/ 20°C. L'ensemble des manipulations est résumé dans la (figure 8).



**Figure 8 :** Cinétique de croissance et d'acidité des souches dans le lactosérum.

### V.2.1. Méthode de mesure du pH

L'évolution du pH dans un lait stérilisé est suivie par mesure du pH à l'aide d'un PH-mètre de type (HANNA) étalonné par les solutions tampon à pH=4 et pH=7.

### V.2.2. Méthode de mesure de l'acidité Dornic

L'acidité des échantillons est déterminée par titrage de l'échantillon du lait par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), N/9 en présence d'un indicateur coloré (phénophtaléine à 1 %). L'acidité est exprimée en degré Donnic °D (1°D = 0,1 g d'acide lactique/ litre).

Pour 10 ml de l'échantillon à analyser, on ajoute une à deux gouttes de phénophtaléine à 1 %. L'acidité est titrée à l'aide de soude N/9 contenu dans une burette de Mohr à robinet et versée goutte à goutte en agitant constamment jusqu'au virage vers une couleur rose pâle persistante (10 secondes environ) (**Rhiat et al, 2011**).

## VI. Mise au point de fromage frais de chèvre

### VI.1. Origine du lait

Le lait utilisé dans cette étude est un lait de chèvre de race alpine chamoisé provenant de l'Institut National de Recherche Agronomique d'INRA, d'Ouad-ghir (Bejaia). La chèvre est une bonne laitière, dans des bonnes conditions, elle donne 5 à 6 L de lait par jour. Les échantillons du lait sont prélevés dans les conditions d'hygiène. Ces derniers sont transportés au laboratoire dans une glacière.

### VI.2. Analyses effectuées

#### VI.2.1. Test d'ébullition

Les laits anormaux ou acidifiés coagulent à l'ébullition. Un tube contenant 5ml du lait est porté au bain-marie à 100°C / 5 min.

#### VI.2.2. Estimation de l'activité microbienne (test de la réductase)

La plupart des bactéries se multipliant dans le lait sont capables, grâce à l'action de leurs réductases, d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction jusqu'à décoloration d'un indicateur redox. On utilise généralement le bleu de méthylène dont la forme réduite est incolore (Guiraud, 1998).

La rapidité de la décoloration, due au métabolisme bactérien et directement proportionnelle au nombre de bactéries présentes. La (figure 9) illustre les étapes du test de réductase.

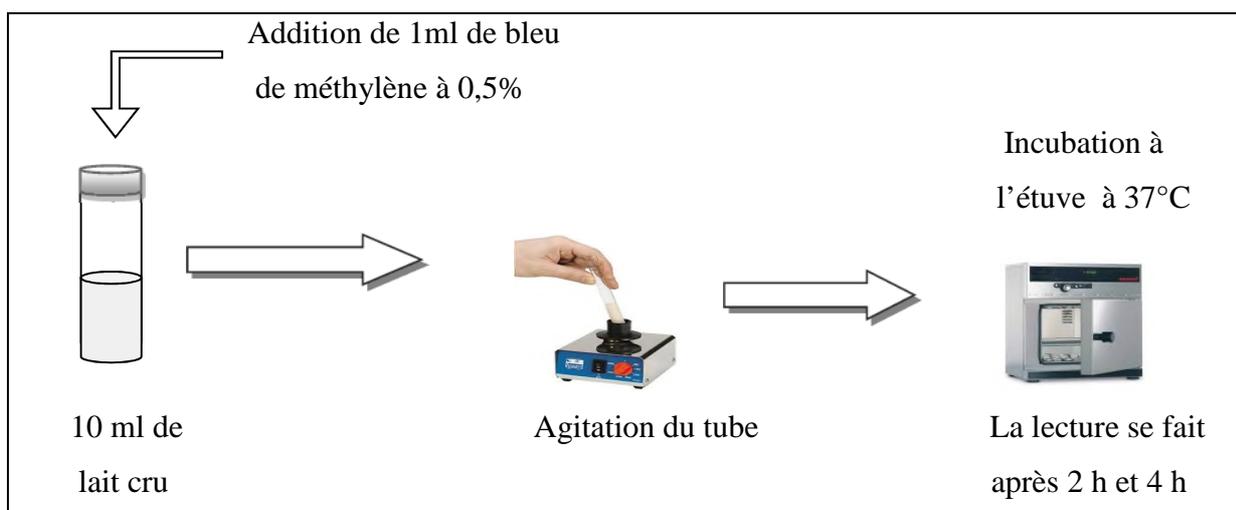


Figure 9 : Test de réductase.

**VI.2.3. Mesure du pH et l'acidité Dornic**

**VI.2.4. Analyses microbiologiques du lait cru de chèvre :**

Les germes à dénombrer et à rechercher sont résumés dans le tableau IV

**Tableau VI : analyse microbiologique du lait (Guiraud, 2003)**

<b>Indicateur de la qualité hygiénique</b>			
<b>Germes</b>	<b>dénombrement</b>	<b>Milieux utilisés</b>	<b>Durée et T°C d'incubation</b>
FTAM	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-9}$ .	GN	48h-72h à 30°C.
Coliforme totaux	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-6}$ .	VRBG	24 h à 37°C
Coliforme fécaux	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-6}$ .	EMB	24 h à 44°C
<b>Germe d'intérêt industriel</b>			
Bactéries lactiques	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-9}$ .	MRS	48 h à 30°C
<b>Recherche et dénombrement des germes pathogènes</b>			
Staphylocoque	Test présomptif : ensemencement de 1 ml du lait dans 9 ml du milieu de Giolitti Contoni	GC	24 à 48 h, 37°C
	Test confirmatif : Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-9}$ .	Chapman	24 à 48 h, 37°C
Salmonella	réalise un pré-enrichissement	FSB	24 h à 37°C
	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-9}$ .	SS	24 h à 37°C
Entérocoque	Ensemencement en masse de 1 ml des dilutions $10^{-1}$ à $10^{-6}$ .	Slanetz + azide de sodium	24 h à 44°C

## VII. Fabrication de fromage frais

La fabrication d'un fromage à pâte fraîche comprend principalement deux étapes successives : la coagulation et l'égouttage (**André et Jean-Claude, 2006**).

La fabrication du fromage frais au lait cru et stérile de chèvre est réalisée au laboratoire. Plusieurs étapes sont effectuées.

### VII.1. Préparation des préferments

Quatre flacons de 200 ml du lait de chèvre stérile sontensemencés comme suit :

- 20 colonies de 48 h à 30°C de *Lc. lactis* sontensemencées dans 200 ml du lait stérilisé ;
- 20 colonies de 48 h à 30°C de *Lb. plantarum* sontensemencées dans 200 ml du lait stérilisé ;
- 20 colonies de 48 h à 30°C de *Lc. lactis* plus 20 colonies de 48 h à 30°C de *Lb. plantarum* sontensemencées dans 200 ml du lait stérilisé ;
- 20 colonies de 48 h à 37°C de *S. aureus* sontensemencées dans 200 ml du lait stérilisé.

### VII.2. Préparation du lait

1, 6 L du lait de chèvre réparti dans quatre flacons (400 ml par flacon) utilisé pour la fabrication des fromages au lait cru.

1,6 L du lait de chèvre est réparti dans quatre flacon (400 ml par flacon), les flacons sont stérilisés au bain marie (Raypa) à 100°C pendant 10 min, après le chauffage un refroidissement est assuré à température ambiante.

### VII.3. Ensemencement

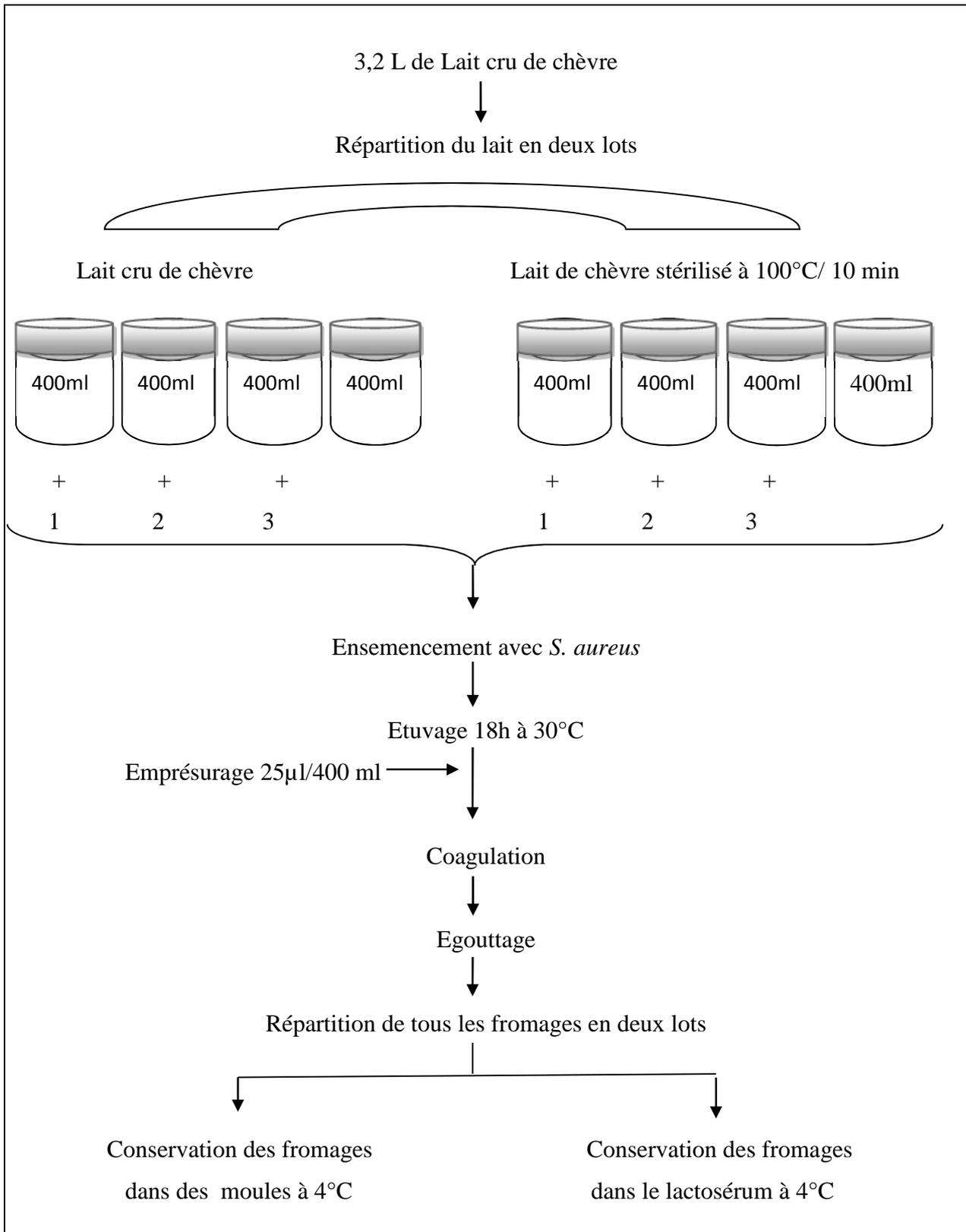
La souche de *S. aureus* a été inoculée dans les laits à une concentration de  $10^8$ UFC /ml du lait. Les laits ont été égalementensemencés avec des preferments lactiques à une concentration de 6ml /400ml pour *Lb. plantarum*, de 6 ml / 400 ml de *Lc. lactis* et de 5ml/400 ml pour *Lb. plantarum* en association avec *Lc. lactis* comme indiqué dans la figure10. Incubation des laits à 30°C /18h.

Huit types de fromages frais sont préparés :

- fromage au lait cru ensementer avec le préferment *Lb. plantarum*.
- fromage au lait cru ensementer avec le préferment *Lc. Lactis*.
- fromage du lait cru ensementer avec la culture mixte (*Lb. plantarum*, *Lc. Lactis*)
- fromage témoin au du lait cru de chèvre ensementer avec *S. aureus*.
- fromages au lait stérilisé ensementé avec le préferment *Lb. plantarum*.
- fromage au lait stérilisé ensementé avec le préferment *Lc. Lactis*.
- fromage fabriqué avec du lait stérilisé ensementé avec la culture mixte.
- fromage témoin au lait de chèvre stérilisé ensementé avec *S. aureus*.

#### **VII.4. Emprésurage**

Il se fait en ajoutant de la présure après 18h à tous les laits en raison de 25  $\mu$ l / 400 ml pour provoquer la coagulation et la formation du caillé. L'égouttage du caillé permet de séparer le caillé solide, composé de caséines (grosses protéines du lait) et de matières grasses, et le lactosérum. (Figure 10).



**Figure 10 :** Procédé de mis au point d'un fromage frais au lait de chèvre.

1: *Lc.lactis*

2 : *Lb.plantarum*

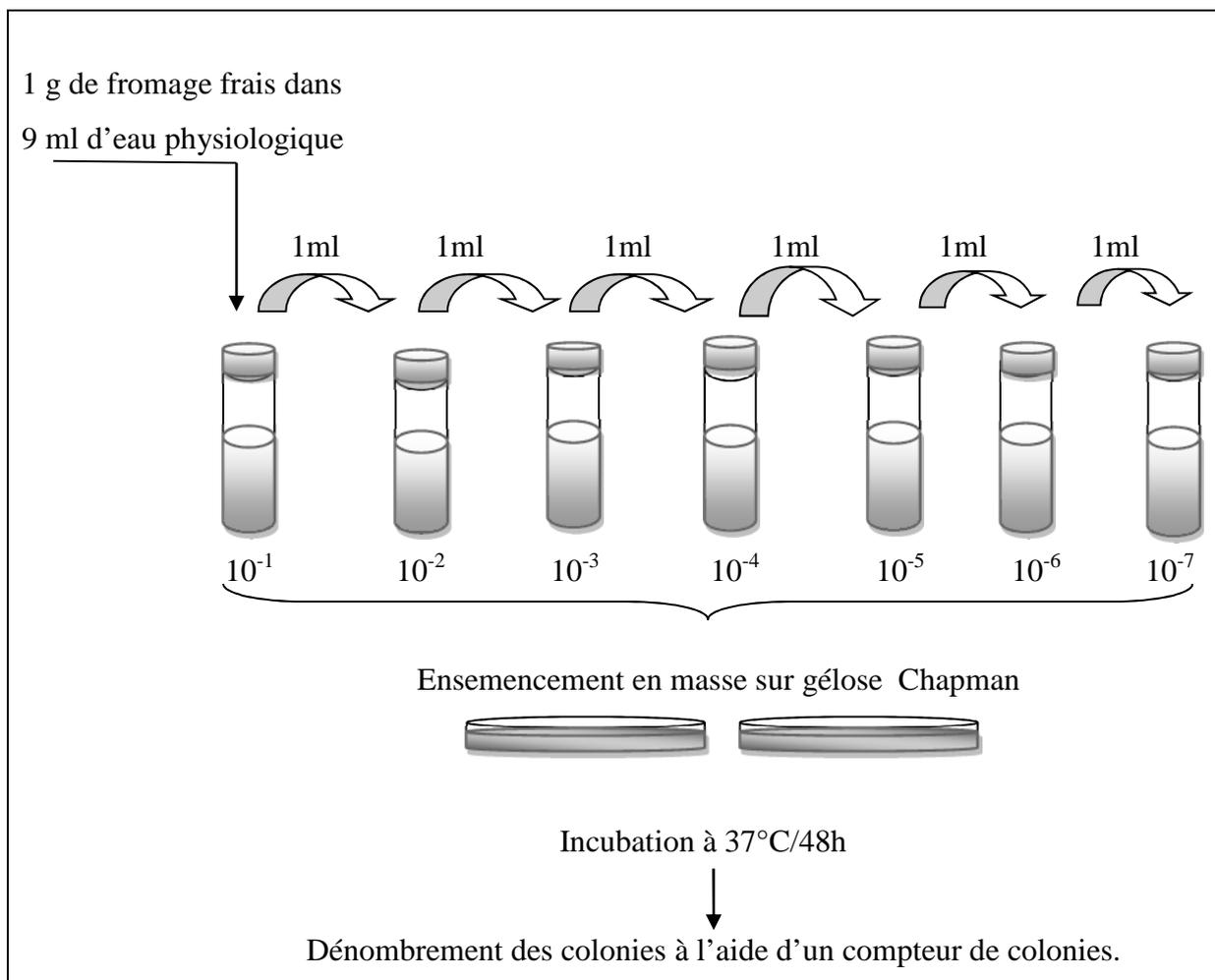
3: culture mixte (*Lc.lactis*, *Lb.plantarum*)

### VIII. Etude de l'évolution de la croissance de *S. aureus* dans les fromages frais

La présence de *S.aureus* dans le lait destiné à la fabrication de fromage est préoccupante. Dans le but d'étudier le pouvoir des lactobacilles et des lactocoques à éliminer *S.aureus* dans le fromage, nous avons suivi l'évolution de la croissance de ce dernier dans les fromages frais fabriqués.

La croissance de *S.aureus* dans le fromage est suivie par des dénombrements sur gélose Chapman au 3<sup>ème</sup> jours de la fabrication puis au 7<sup>ème</sup> jours, 14<sup>ème</sup> jours enfin au 21<sup>ème</sup> jours, pour chaque échantillon de fromage.

1g de fromage de chaque lot est prélevé et mis dans 9 ml d'eau physiologique. Après une forte agitation par le vortex (VELP), des dilutions décimales sont réalisées. 1ml de chaque dilution (à partir de  $10^{-1}$ ... $10^{-7}$ ) est ensemencé en masse sur gélose Chapman. L'incubation s'effectue à 37°C / 24 h (figure 11).



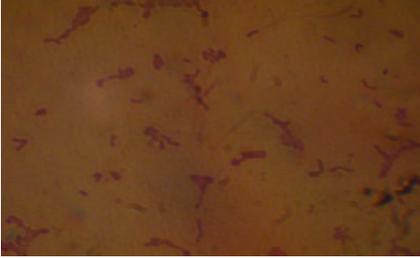
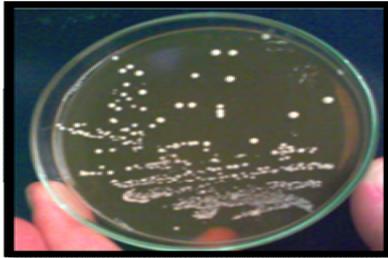
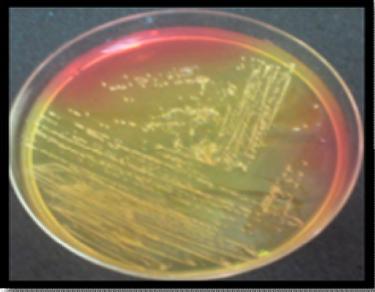
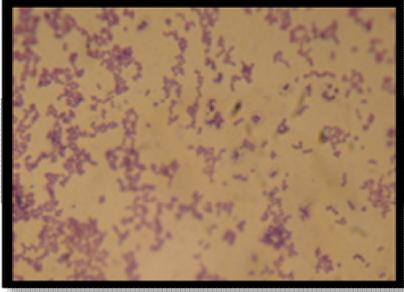
**Figure 11** : Dénombrement de *S. aureus* dans le fromage.

## ***Résultats et discussions***

**I. Vérification de la pureté des souches**

Les résultats de l'observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram) réalisés sur les colonies des bactéries lactiques utilisées dans cette étude, développées sur gélose MRS à 30°C/48h et le pathogène *S. aureus* cultivé sur gélose Chapman à 37°C/24h montrent que les bactéries utilisées sont pures et non contaminées (Tableau VII).

**Tableau VII** : caractère des souches utilisées

caractères Souches	Aspect des colonies sur gélose	Observation microscopique	catalase
<i>Lc. lactis</i>	 Petites colonies blanchâtre, bombées	 Coques (cocci) Gram Positif	Négative
<i>Lb. plantarum</i>	 Petites colonies lenticulaires blanchâtre, bombées	 Bacilles Gram Positif	Négative
<i>S. aureus</i>	 Petites colonies jaunâtre	 Coques en paires ou en grappes de raisin Gram Positif	Positive

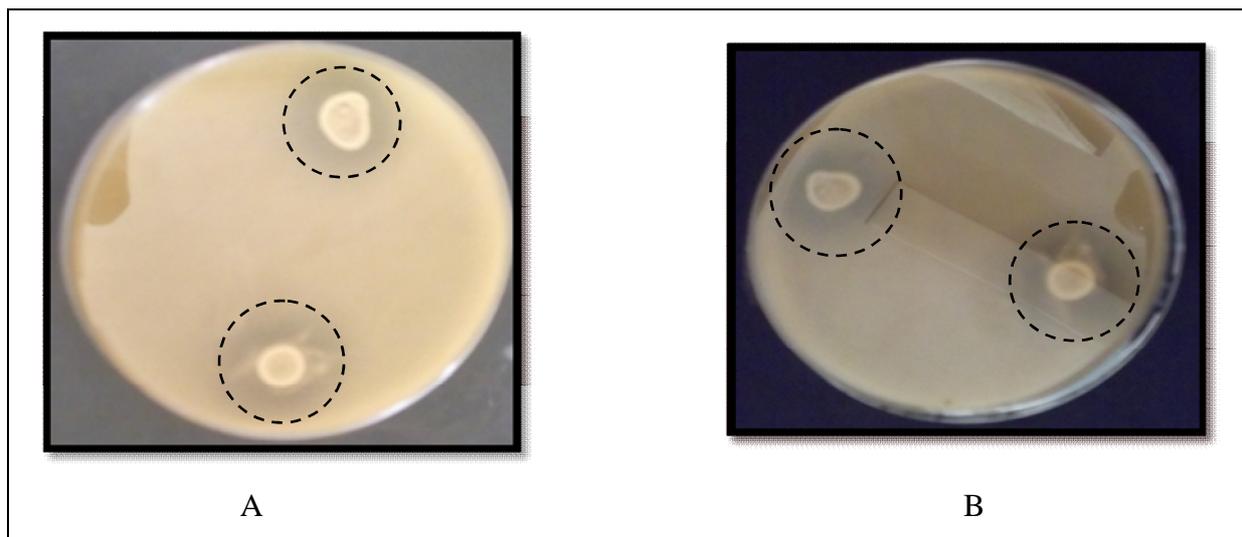
## II. Standardisation des inocula bactériens

Le but de la standardisation de l'inoculum, est d'avoir le même nombre de cellules bactériennes vivantes dans 1ml de culture durant toute l'expérimentation.

Après le dénombrement effectué pour *Lc. lactis*, *Lp. plantarum* et *S. aureus*, le nombre des cellules viables obtenus après ensemencement de 4 colonies de *Lc.lactis* et 2 colonies de *Lb.plantarum* dans de 9ml de bouillon MRS est respectivement de  $8,95 \times 10^7$  UFC/ml;  $63,3 \times 10^8$  UFC/ml cependant *S. aureus* donne un nombre de  $1,83 \times 10^7$  UFC/ml a partir de 2 colonies ensemencé dans le BN.

## III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus* par le test des spots

Le test des spots a révélé une bonne activité antibactérienne des souches *Lc.lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus* la figure (12).



**Figure 12** : Zones d'inhibition de test des spots. A : *Lc.lactis* à l'égard de *S.aureus*,  
B: *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus*.

L'activité antibactérienne illustrée dans la figure (2) représentée par l'apparition des zones d'inhibition indique que les souches *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* pourraient synthétiser des substances antibactériennes à l'égard de *S. aureus*.

La souche *Lc. lactis* a montré un diamètre d'inhibition de 16mm alors que 19mm de diamètre des zones d'inhibition a été mesuré en utilisant *Lb. plantarum*.

Cet antagoniste pourrait être dû à la production de substances ou de métabolites qui ont un effet anti-staphylococcique. Ces métabolites peuvent être des acides organiques, de peroxyde d'hydrogène ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines. Les bactéries lactiques produisent une variété de métabolites capables d'interférer avec la croissance d'autres microorganismes (Vandenbergh, 1993). D'après Elmoualdi et al., (2008), l'activité antibactérienne des lactocoques est due à une substance extracellulaire, de nature peptidique et thermostable ce qui reprend aux caractéristiques des bactériocines.

Les différentes espèces de Lactobacilles produisent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des bactériocines qui pourraient affecter les souches indésirables ou pathogènes (Otero et al., 2006).

#### IV. Antibiogramme des souches de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et *S.aureus*

L'effet des 6 antibiotiques est testé sur les 3 souches utilisées dans cette étude. Les résultats obtenus sont représentés le tableau VIII et la Figure (13).

**Tableau VIII:** résultats des antibiogrammes des souches de *Lc.lactis*, *Lb.plantarum* et *S.aureus*.

ATB	Charge du disque	Diamètre (mm)			Diamètres critiques (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	S	R
Ampiciline	10 µg	0 (R)	-	-	≥ 21	< 16
Cefalixine	30 µg	0 (R)	18 (S)	16 (I)	≥ 18	< 12
Spiramycine	100 µg	0 (R)	18 (S)	18 (S)	≥ 24	< 19
Cefoxitine	30 µg	0 (R)	0 (R)	0 (R)	≥ 27	< 25
Vancomycine	30 µg	0 (R)	0 (R)	0 (R)	≥ 17	-
Oxacilline	5 µg	0 (R)	14 (R)	15 (R)	≥ 27	< 25

R : Résistance

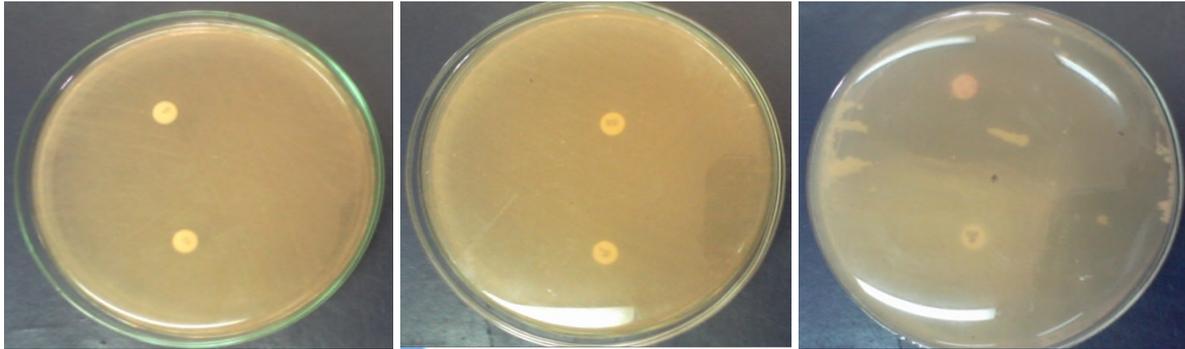
S : Sensibilité

I : Intermédiaire

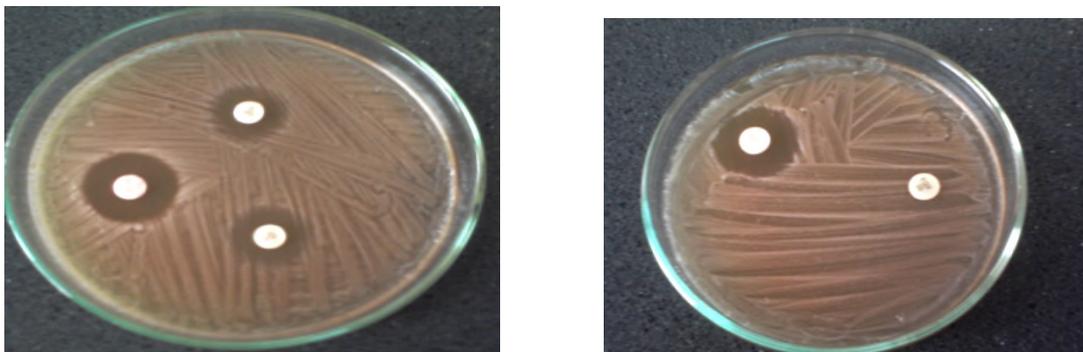
ATB : Antibiotique

La détermination du types de bactéries selon le diamètre de zone d'inhibition, à été faite en se référant à la recommandation CA-SFM, (2012).

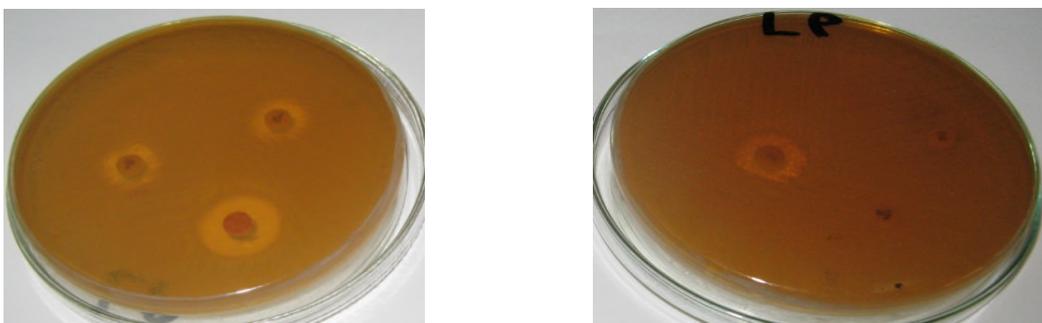
En effet le *S. aureus* présente une résistance à tous les antibiotiques testés, *Lc. lactis* a une résistance à trois antibiotiques (oxacilline, vancomycine, cefoxitine et sensible au spiramycine et au céfalixine, cependant *Lb.plantarum* présente une résistance à l'oxacilline, vancomycine et cefoxitine), sensible au spiramycine et intermédiaire au cefalixine.



Antibiogramme du *S. aureus*



Antibiogramme de *Lc. Lactis*



Antibiogramme de *Lb. plantarum*

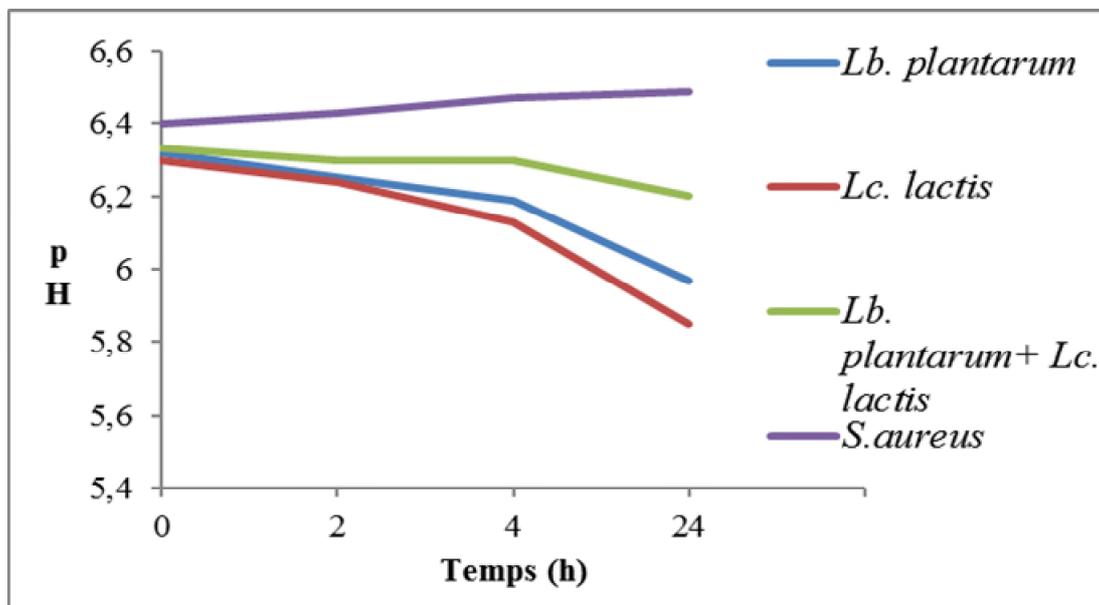
**Figure 13** : antibiogrammes des souches de *S. aureus*, *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.

## V. Cinétique de croissance et l'acidification des souches dans le lait

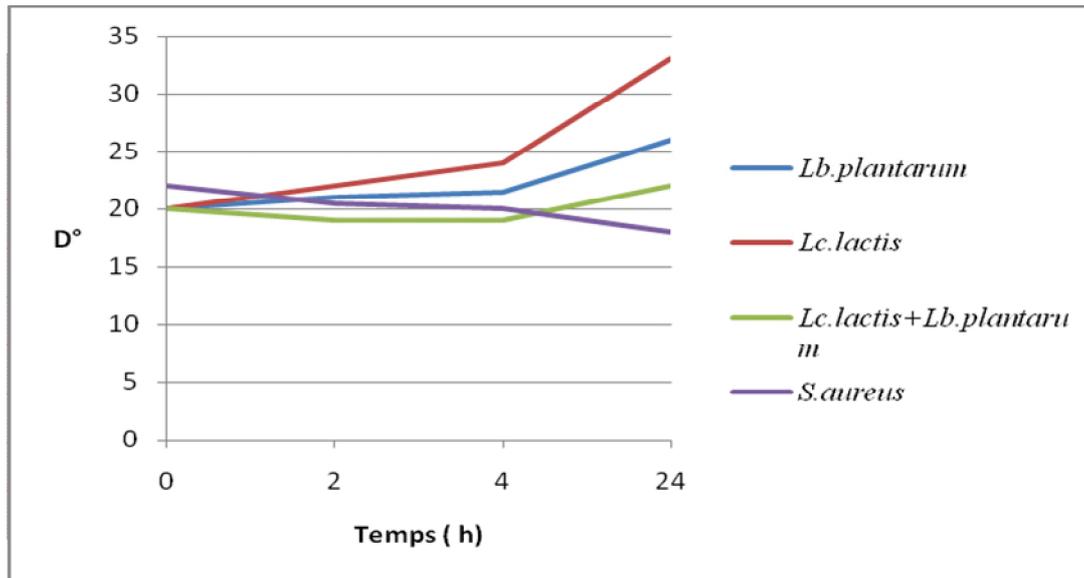
La cinétique d'acidification est un paramètre très important pour la caractérisation de souches acidifiantes appliquées dans le processus de fabrication du lait fermentés et de fromages. L'acidification est une conséquence de l'accumulation du lactate dans le milieu suite à une dégradation du lactose et donc un abaissement notable de pH et augmentation de l'acidité titrable (**chamba et al., 1994**).

### V.1. Cinétique d'acidification dans le lait de chèvre stérile

Les figures (14) et (15) représentent respectivement l'évolution de pH et de l'acidité titrable en fonction du temps, des souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* + *Lc. lactis* et *S. aureus*.



**Figure 14** : Evolution du pH du lait de chèvre stérile ensemencé avec les souches de *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* + *Lc. lactis* et *S. aureus*.



**Figure 15** : Evolution de l'acidité dornic du lait de chèvre stérile ensemencé avec les souches de *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*+ *Lc. lactis* et *S. aureus*.

A l'état initial, le pH et l'acidité Dornic du lait de chèvre ensemencé avec *S. aureus* figure (14) et (15) est 6,4 et 22°D respectivement, après 24h ; le pH augmente de 0,05 unités et l'acidité Dornic diminue de 5 unités, cependant cette souche ne présente pas une bonne acidification du fait que le pH et l'acidité Dornic ont presque resté stable durant la période d'incubation.

Le pH et l'acidité Dornic initial pour les laits ensemencés avec *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* en culture pure ou mixte est de 6,32 et 20°D, Après 24 heures d'incubation dans le lait stérile de chèvre, les souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et la culture mixte ont donné des acidifications avec respectivement 5,85, 5,97, 6,2 et des acidités titrable de 33, 26 °D et 22°D.

*L. lactis* produit de l'acide lactique par fermentation des glucides simples ou oses (fermentation lactique) et tolère des pH acides. Elle a pour rôle essentiel d'acidifier le lait et le caillé, de participer à la formation du goût (protéolyse, production d'arôme), de la texture et de l'ouverture des produits laitiers (fromage, beurre, yaourt, lait fermenté) (Hermier, 1992). De ce fait les résultats obtenus dans la figure (14) sont en accord avec Hermier (1992) sur l'action des bactéries lactiques qui induit la diminution du pH et l'acidification du lait.

V.2. Cinétique de croissance dans le lait de chèvre stérile des souches de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*+*Lb. plantarum* et *S.aureus*

Cette étude a été réalisée en suivant l'évolution du nombre de *S. aureus*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* en culture pure ou mixte en fonction du temps. Les dénombrements ont été effectués toutes les deux heures pendant 24 heures à 30°C.

Du fait que le lait est un milieu très favorable pour la croissance des bactéries pathogènes, cela explique parfaitement les résultats représenté sur la figure (6), qui montre une nette augmentation du nombre de *S. aureus* de  $10^4$  UFC/ml à  $10^7$ UFC /ml au bout 24 h. On remarque une augmentation du nombre de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* en culture pure ou en association des deux souches, en passant de  $10^6$  UFC/ml à  $10^8$  UFC /ml ; pour les cultures pures et  $2,62.10^6$  à  $9,9.10^8$ UFC/ml pour la culture mixte.

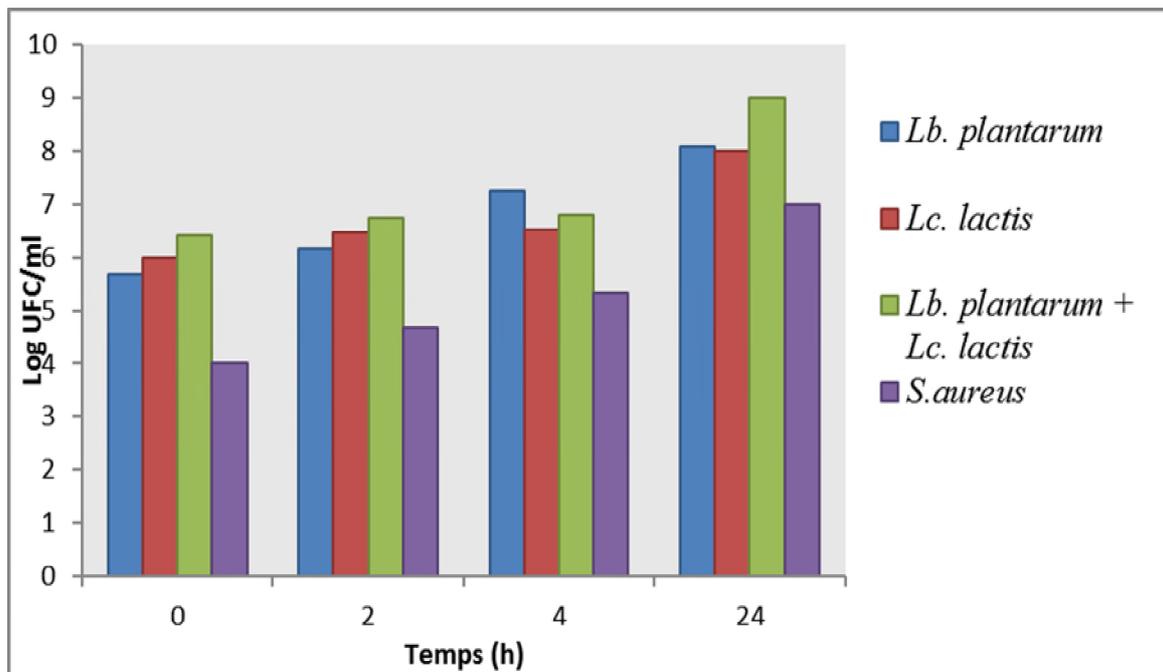


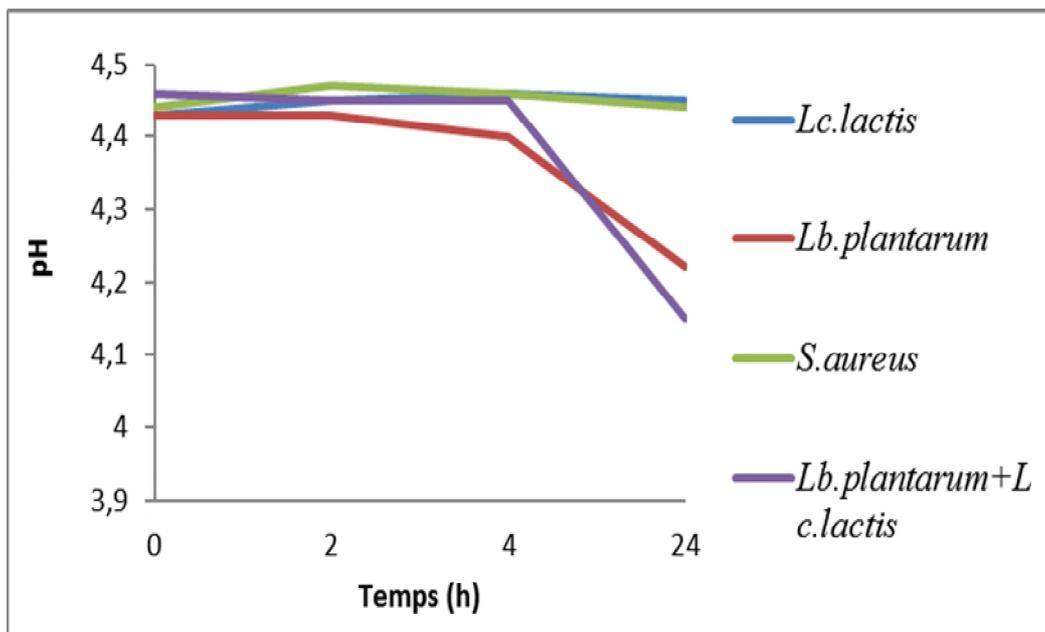
Figure 16 : Evolution de la croissance de *Lc.lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc.lactis*+*Lb. plantarum* et *S.aureus* dans le lait de chèvre stérile.

## VI. Cinétique de croissance et l'acidification des souches dans le lactosérum

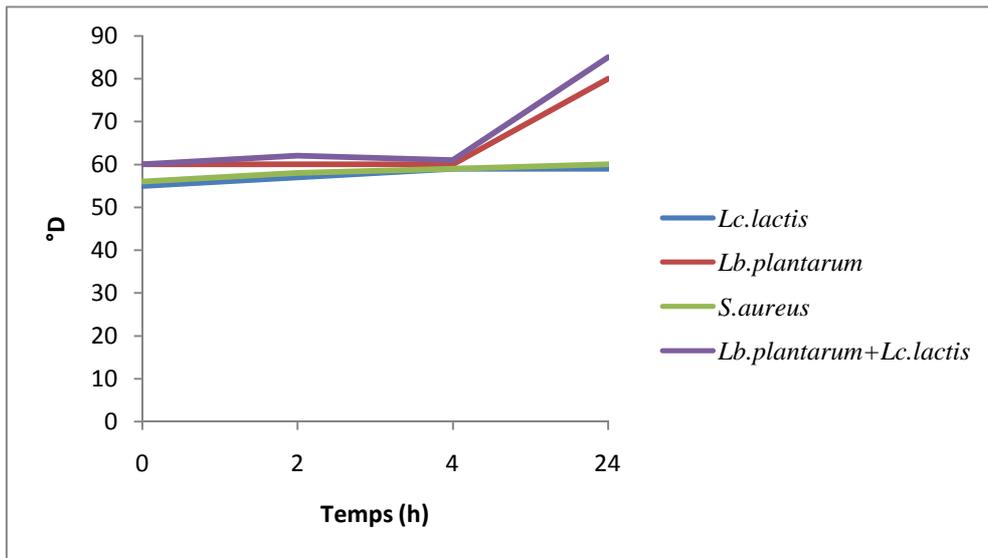
### VI.1. Cinétique d'acidification des souches de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*+*Lb. plantarum* et *S.aureus*

Les figures (17) et (18) montrent que l'évolution du pH et l'acidité Dornic des lactosérumsensemencés avec les souches *Lc. lactis* et *S. aureus* suit la même allure, on note une légère diminution de de l'ordre 0,01 unité du pH et 1°D d'acidité Dornic.

Le pH et l'acidité Dornic des lactosérumsensemencés avec la souche *Lb. plantarum* et la culture mixte sont restés stables pendant 4h. A partir de 4h on constate une décroissance notable, on passant d'un pH de 4,4 à un pH de 4,25 pour *Lb. plantarum*, cela est accompagné par une augmentation de 11°D; le pH diminue de 0,31 et de 16 unité d'acidité Dornic pour la combinaison *L. plantarum* et *Lc. lactis*.



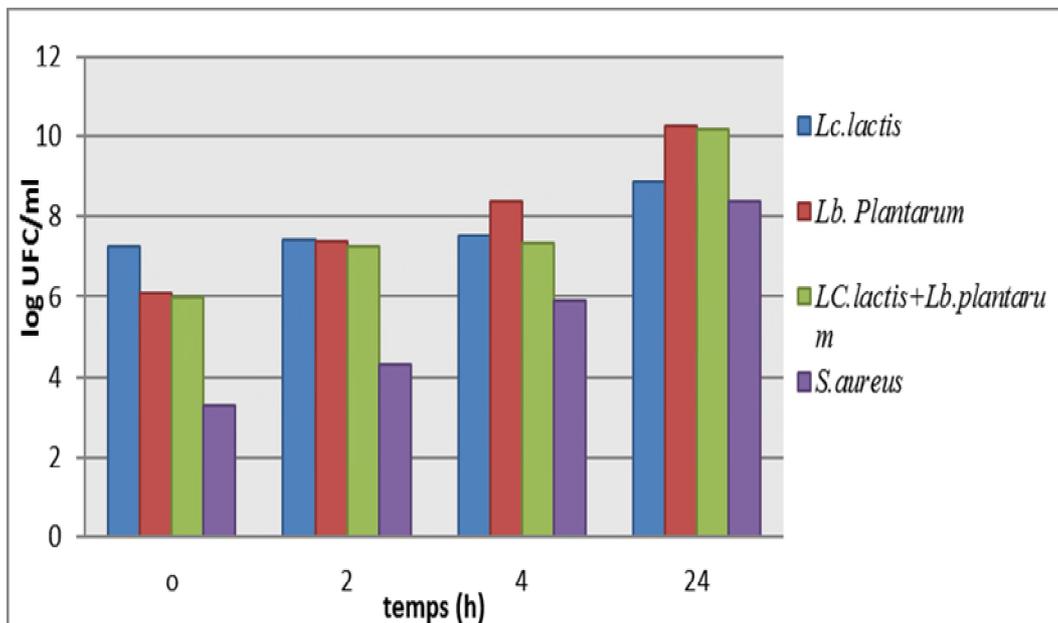
**Figure 17 :** Evolution du pH dans le lactosérum stérileensemencé avec les souches de *Lb.plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*+ *Lc. lactis* et *S.aureus*.



**Figure 18 :** Evolution de l'acidité Dornic dans le lactosérum stérile ensemencé avec les souches de *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum+ Lc. lactis* et *S.aureus*.

## VI.2. Cinétique de croissance des souches de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S.aureus* dans le lactoserum

La croissance est évaluée périodiquement toutes les 2 h pendant 24 h par un dénombrement donnant les résultats représentés dans la figure (19).



**Figure 19 :** Evolution de la croissance des souches de *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lb. plantarum+ Lc. lactis* et *S. aureus* ensemencé dans le lactosérum.

Le nombre de cellules étant de  $1,7 \cdot 10^6$  UFC/ml pour *Lc. Lactis*,  $1,28 \cdot 10^7$  UFC/ml pour *Lb. plantarum*,  $2,97 \cdot 10^5$  UFC/ml pour l'association de ces deux souches,  $2 \cdot 10^3$  UFC/ml pour *S. aureus*, n'a pas cessé d'augmenter durant la période d'incubation, pour atteindre au bout de 24 h une population de  $7,5 \cdot 10^8$  UFC/ml de *Lc. lactis*,  $1,7 \cdot 10^{10}$  UFC/ml de *L.plantarum*,  $2,38 \cdot 10^8$  UFC/ml de *S. aureus* et  $1,5 \cdot 10^{10}$  UFC/ml pour la culture mixte.

## VII. Mise au point d'un fromage frais de chèvre

### VII.1. Evaluation de la qualité hygiénique du lait cru de chèvre

#### VII.1.1. Test d'ébullition

Les laits anormaux ou acidifiés coagulent à l'ébullition. Un tube contenant 5ml du lait est porté au bain-marie à  $100^{\circ}\text{C}$  /5 min a donné une coagulation négative. Cela signifie que le lait est normal.

#### VII.1.2. Mesure du pH et titration l'acidité Dornic

Le lait présente une légère acidité qui se mesure en potentiel d'hydrogène (pH 6,42 environ) et plus souvent en degrés Dornic ( $^{\circ}\text{D}$ ). Un degré Dornic correspond à un décigramme d'acide lactique par litre du lait. A sa sortie de la mamelle, le lait de chèvre est à  $15^{\circ}\text{D}$  (Zeller, 2005).

En se référant aux données de Guiraud (2003) (tableau IV), on déduit que le lait analysé est d'une qualité moyenne car il présente un pH de 6,42 et une acidité Dornic de  $20^{\circ}\text{D}$ .

Tableau IX : résultats de la mesure du pH et d'acidité Dornic.

Test	Résultats	Norme (Guiraud, 2003)
pH	6,42	6,5 à 6,8
Acidité Dornic	20	$< 17^{\circ}\text{D}$

#### VII.1.3. Test de réductase

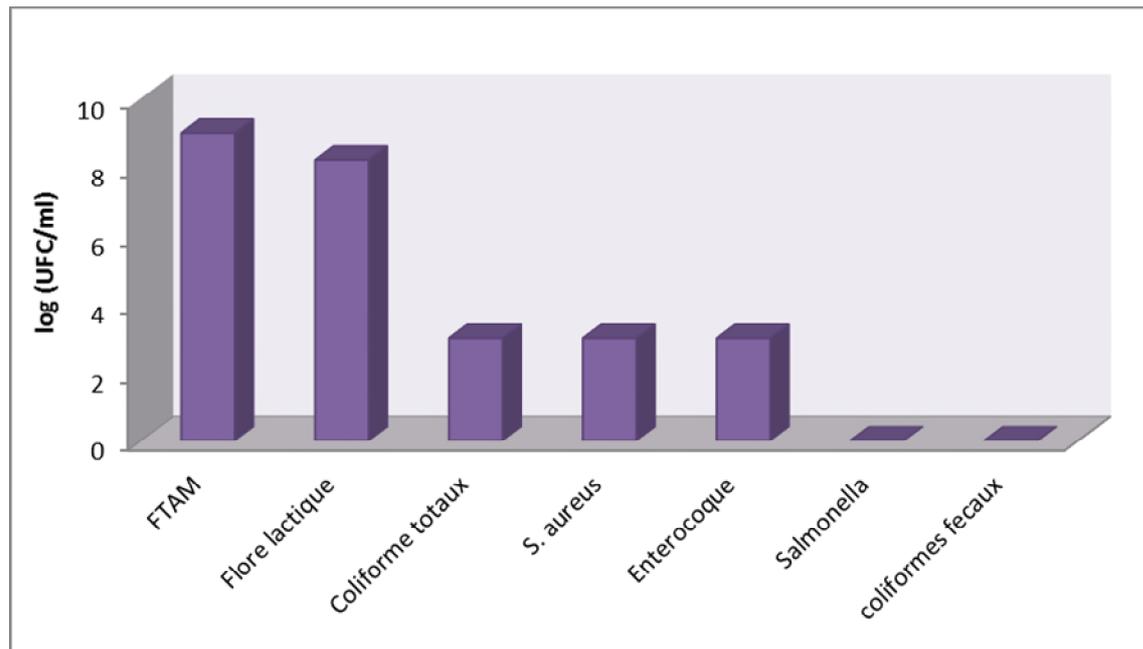
Le lait analysé présente une réduction du bleu de méthylène au bout de 3 heures. On comparant le résultat obtenu aux résultats cités dans le tableau(X) inspiré de (Guiraud, 2003), on déduit que le lait est peu contaminé.

**Tableau X:** Classement des laits en fonction des tests de réduction (Guiraud, 2003).

NOTE	Appréciation	Temps de réduction du bleu de méthylène
1	Lait contaminé	$t < 2 \text{ h}$
2	Lait peu contaminé	$2\text{h} < t < 4\text{h}$
3	Lait de bonne qualité	$4\text{h} < t$

#### VII.1.4. Analyse microbiologique du lait cru de chèvre

Les analyses microbiologiques habituelles du lait cru concernent le dénombrement de la flore totale et des coliformes, néanmoins pour une meilleure appréciation de la qualité microbiologique, une analyse plus complète a été réalisée figure (20). Cette analyse consiste en un dénombrement de la flore totale, flore lactique, les coliformes totaux et fécaux, les enterocoques, *S. aureus* et salmonelle.



**Figure 20 :** Résultat de l'analyse microbiologique du lait cru de chèvre.

Les résultats obtenus indiquent la présence de la majorité des flores témoignées d'une mauvaise qualité hygiénique. La charge microbienne totale du lait cru est relativement plus importante ( $10^9$ UFC/ml). La réglementation nationale s'accorde sur le fait qu'une charge supérieure à  $10^5$ UFC/ml signifie une contamination importante.

L'ensilage mal préparé associé à une mauvaise hygiène de la traite constitue les causes majeures de la présence de bactérie pathogène telles que les staphylocoques.

Par comparaison aux normes Algériennes tirées de l'arrêté interministériel issu du J.O.R.A (Journal Officiel de la République Algérienne) n°35 du 27 Mai 1998/ Aouel Safar 1419, le lait analysé n'est pas de bonne qualité microbiologique (tableau VI). En effet, on constate une teneur en flore totale ( $10^9$  UFC/ml), et en *S. aureus* ( $10^3$  UFC/ml). Cela signifie qu'il présente un défaut d'hygiène dû probablement la traite manuelle.

**Tableau VI :** Critères microbiologiques du lait cru (J.O.R.A) en comparaison avec les résultats obtenu

Germes	Résultats obtenus (UFC/ml)	Normes J.O.R.A , (1998) (UFC/ml)
<i>Germes aérobies à 30°C</i>	$10^9$	$10^5$
<i>Coliformes fécaux</i>	Absence	$10^3$
<i>S. aureus</i>	$10^3$	Absence

## VII.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de *Lc.lactis* et *Lb.plantarum* à l'égard du *S. aureus* dans le fromage de chèvre cru ou stérilisé conservé ou non dans le lactosérum

### VII.2.1. Fromage frais au lait cru et stérile de chèvre

Les fromages frais obtenus après coagulation par l'action de la présure au lait cru de chèvre, possèdent des textures souples tranchables, frais à pâte blanches légèrement ferme. Les fromages aux laits de chèvre stérile, possèdent des textures onctueuses, frais à pâte jaune. Au bout de huit jours, la saveur et l'arôme caprin apparait. Chaque fromage obtenue est divisé en deux une partie conservé dans le lactosérum et l'autre partie conservé dans une boite de pétri à 4°C (figure 21).



**Figure 21** : fromage au lait cru et stérile de chèvre conservé ou non dans le lactosérum

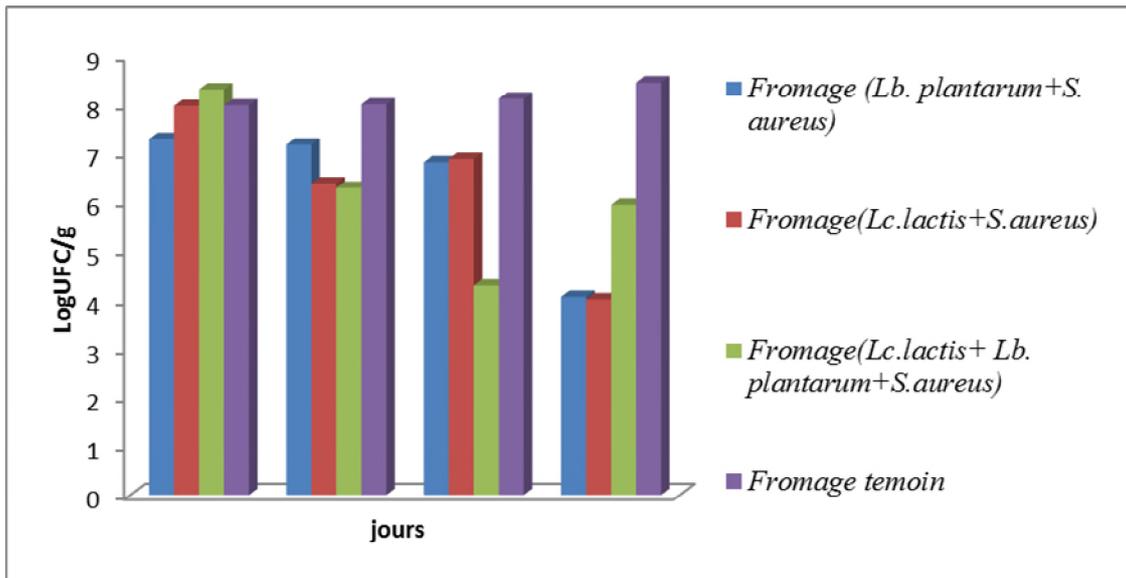
Au cours de la fabrication, et la conservation des fromages frais, le comportement des micro-organismes utiles ou pathogènes est fortement lié aux paramètres technologiques tels que la nature et l'activité des ferments lactiques, la vitesse et le niveau d'acidification du caillé (**Morgane et al, 2000**).

Les fromages de chèvre peuvent être fabriqués selon deux types de technologie : lactique et à présure. La technologie lactique comprend une phase de coagulation lente qui conduit à une forte acidification. La technologie à présure implique quant à elle une coagulation plus rapide, mais un niveau d'acidification plus faible (**Morgane et al, 2000**).

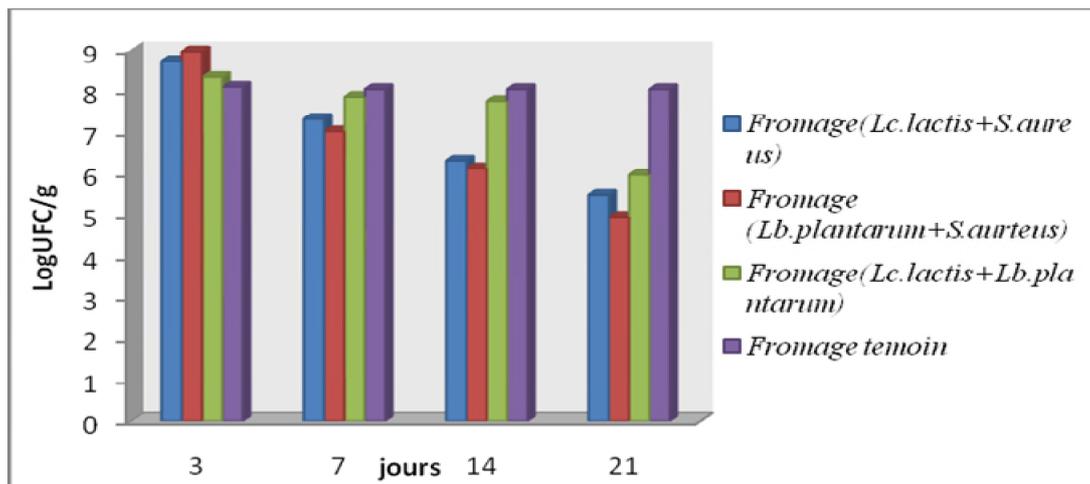
Bien que de nombreux travaux aient été menés sur le développement des bactéries pathogènes dans les fromages au lait cru de vache, il est difficile de transposer les résultats obtenus au cas des fromages de chèvre (**Morgane et al, 2000**). Dans ce contexte, on a étudié le comportement de *S. aureus*, une bactérie majeure dans les fromages de chèvre au lait cru ou stérile conservé ou non dans le lactosérum, fabriqués selon la technologie à présure.

L'antagonisme de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* vis-à-vis *S. aureus* dans le fromage frais, a été observé par un suivi de la croissance de ce dernier pendant 21 jour.

Les résultats de suivi dans le fromage de chèvre au lait cru et stérile non conservé dans le lactosérum sont présentés dans les figures (22) et (23).



**Figure 22 :** Evolution de *S. aureus* dans les fromages frais de chèvre au lait stérilisé.



**Figure 23 :** Evolution de *S. aureus* dans les fromages frais de chèvre au lait cru.

Pour le fromage témoin, le nombre de *S. aureus* connaît une légère augmentation qui est pratiquement stable, il est d'ordre de  $1,45 \cdot 10^8$  UFC/g au 3<sup>ème</sup> jour et de  $3,1 \cdot 10^8$  UFC/g après le 21<sup>ème</sup> jour (fromage au lait stérile de chèvre), dans le fromage au lait cru de chèvre, au 3<sup>ème</sup> jour le nombre de *S. aureus* était de  $4 \cdot 10^8$  UFC/g,  $8 \cdot 10^8$  UFC/g au 21<sup>ème</sup> jour.

On comparaison avec le fromage témoin on observe une diminution de 1log en moyenne du nombre de *S. aureus* dans les fromages fabriqués avec les souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et la combinaison de ces deux dès le 3<sup>ème</sup> jour de conservation.

Au 21<sup>ème</sup> jour, le nombre de *S. aureus* connaît une remarquable diminution pour atteindre 10<sup>4</sup>UFC/g en moyenne. L'addition de la souche *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* et *Lc. lactis Lb. plantarum* ensembles aurait donc permis une réduction de nombre de *S. aureus* au bout du 21<sup>ème</sup> jour de stockage.

Les résultats obtenus témoignent de l'effet inhibiteur exercé par ces souches lactiques sur la croissance de *S. aureus* durant toute la période de conservation, une réduction de 4 log de *S. aureus* au 21<sup>ème</sup> jour de conservation (les deux fromages) dans les fromages au lait stérile de chèvre et dans le fromage au lait cruensemencé avec *Lb. plantarum* et une diminution de 3log de nombre de *S.aureus* dans le fromage au lait cru de chèvre encemencé avec *Lc.lactis* et le fromageensemencé avec la combinaison par rapport au fromage témoin, et cela pour un même pH final. Ce qui laisse penser que *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* seraient bien productrices de substances inhibant la croissance de *S. aureus* dans le fromage.

**Rodriguez et al., (2000)** ont trouvé que durant la fabrication de fromages avec des souches de *Lc. lactis* productrice de nisine, ces fromages contenaient 0,82 log de *S. aureus* de moins que du fromage fabriqué avec des starters commerciaux, indiquant l'importance du rôle des souches productrices de bactériocines dans le contrôle du développement de *S. aureus* dans les fromages.

Les résultats obtenus montrent que les souches *Lc.lactis* ; *Lb.plantarum* ne révèlent leur maximum d'effet inhibiteur qu'à partir du 21<sup>ème</sup> jour de conservation, ce qui laisse envisager l'utilisation de ces souches dans la fabrication de fromage affinés, dans lesquelles elles pourraient exercer leur effets inhibiteur pendant la période d'affinage.

**Nascimento et al, (2008)**, ont trouvé que l'addition de cultures bactériocinogènes de *Lc. lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC01 et *E. faecium* FAIR-E 198 dans des fromages inoculés par *B.cereus*, *S. aureus* ATCC27154 et *L. monocytogenes* Scott A, n'a présenté qu'un léger effet bactériostatique sur *Listeria* et *Staphylococcus*. Ils ont interpréter l'absence d'action inhibitrice dans le fromage par la grande activité protéolytique des starters utilisés, qui a neutralisé l'activité des bactériocines au bout du 21<sup>ème</sup> jour.

Les résultats rapportés sur les figures (22), (23) montrent que la croissance de *S.aureus* dans le fromage témoin est presque stable, c'est-à-dire après 21 jours de conservation le nombre de cellules n'a même pas atteint 1 Log, de ce fait en peut expliquer ça par la relation de compétition vers les nutriments entre les bactéries de la même espèce.

VII.2.2. Fromage frais au lait cru et stérile conservé dans le lactosérum

Les résultats des dénombrements de *S. aureus* dans les fromages frais au lait cru ou stérile de chèvre conservé dans le lactosérum, sont enregistrés dans les figure (24) et (25).

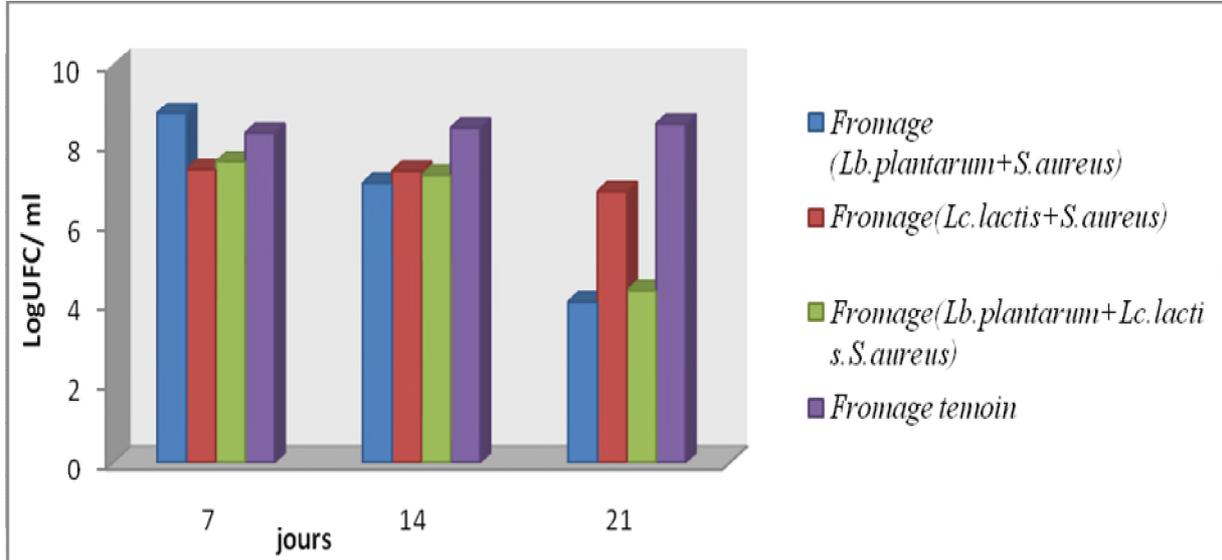


Figure 24 : Evolution de *S. aureus* dans les fromages frais au lait stérilisé conservé dans le lactosérum.

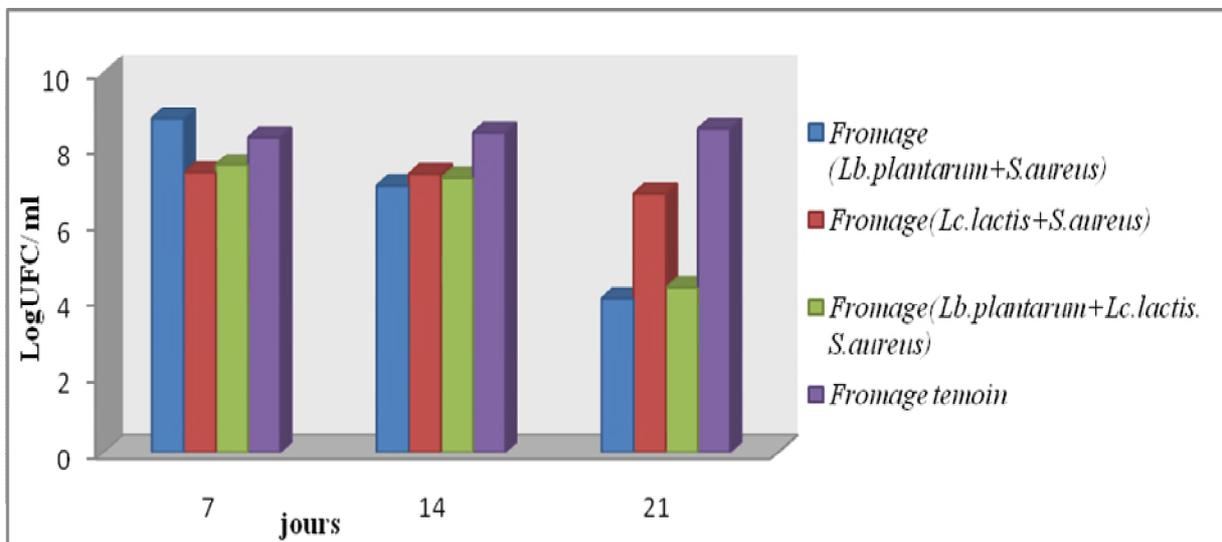


Figure 25 : Evolution de *S. aureus* dans le fromage frais au lait cru conserver dans le lactosérum.

En comparaison avec le fromage témoin, La diminution du nombre de *S. aureus* est moins remarquable (1 log) au 7<sup>ème</sup> jour ainsi qu'au 14<sup>ème</sup> jour pour les deux types de fromage (au lait cru et lait stérile), par contre on observe une diminution importante jusqu'à 10<sup>4</sup> UFC/g

environ, dans le cas d'un fromage inoculé avec *Lb. plantarum* seul ou en association avec *Lc. lactis* au bout de 21<sup>ème</sup> jour, cela témoigne d'un effet inhibiteur de cette souche vis-à-vis *S. aureus*.

La diminution de nombre de *S. aureus* pour le fromage inoculé avec *Lc. lactis* est de 2 log après 21 jour de conservation dans le lactosérum dans ce cas on constate que *L. lactis* n'a pas un effet inhibiteur considérable à l'égard de *S. aureus*, par rapport au fromage inoculé avec *Lb. plantarum*, cela pourrait être expliqué par l'inhibition de la synthèse des substances inhibitrices par *Lc. lactis*.

Il apparaît également que l'acidité développée par les bactéries elles-mêmes contribue au ralentissement et à l'arrêt de la croissance. A ce titre les travaux **Allouche et al (2010)**, révèlent que la sécrétion de bactériocines est fortement dépendante du pH initial, du milieu de production; ceci suggère que le pH du milieu facilite à la fois la sécrétion et la solubilité de la bactériocine dans le milieu de production.

*Conclusion*

## Conclusion

Les caractéristiques d'ubiquiste, de résistance font de *S. aureus* un pathogène particulièrement apte à contaminer et à se développer dans des denrées alimentaires notamment d'origine animale.

La contamination bactérienne des fromages, représente un haut risque pour la santé humaine. Etant donné qu'aucun traitement d'assainissement n'ait appliqué, il serait judicieux d'incorporer dans le produit une flore lactique protectrice, douée d'activité antibactérienne.

Dans ce contexte, cette étude a été consacrée à la recherche de l'effet antagoniste que peut présenter *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus* lors de la mise au point d'un fromage frais au lait cru de chèvre après sa conservation dans le lactosérum.

Les souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* en culture pure et mixte ont été caractérisées du point de vue technologique par le suivi de l'évolution du pH et l'acidité Dornic, elles ont également été testée pour leurs activité antibactérienne en utilisant le test des spots; les résultats ont montré que ces deux souches possèdent un pouvoir acidifiant. *Lc. lactis* a donné un pH de 5,8 et *Lb. plantarum* un pH de 5,97 et un pH de 6,2 pour la culture mixte après 24h d'incubation, et des fortes activités anti-Staphylococcique. *Lc. lactis* a montré un diamètre d'inhibition de 16mm et 19mm a été mesuré pour *Lb. plantarum*.

L'effet antimicrobien a été également étudié dans les 16 échantillons de fromage frais au lait de chèvre. Le suivi de l'évolution de *S. aureus* pendant 21 jours de stockage à 4°C a montré que ce dernier était significativement réduit avec une diminution de 4log de nombre de *S.aureus* par rapport au fromage témoin:

- Dans les fromages au lait stérile de chèvre non conservé dans le lactosérum
- Dans le fromage au lait cruensemencer avec *Lb. planrarum* non conservé dans le lactosérum,
- dans les fromages au lait cru ou stérile de chèvre conservé dans le lactosérumensemencé avec *Lb.plantarum* en culture pure ou mixte ;

Une diminution de 3log de nombre de *S.aureus* dans les fromages au lait cru de chèvreensemencé avec *Lc.lactis* en culture pure ou mixte par rapport au fromage témoin;

Une diminution de 2log de nombre de *S.aureus* dans les fromages au lait de chèvre conservédans le lactosérumensemencé avec *Lc.lactis* par rapport au fromage témoin.

Par ailleurs ces souches ne révèlent leurs maximum effets inhibiteurs qu'à partir du 21<sup>ème</sup> jour de conservation.

En perspective, cette étude qui reste préliminaire doit être complétée par d'autres études relatives a :

- La recherche de l'activité antimicrobienne de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* envers d'autre espèce pathogènes.
- La mise en évidence de la nature des substances antimicrobiennes produites par *Lc.lactis* et *Lb. plantarum*, leurs purification et caractérisation.
- La détection et la caractérisation des enterotoxines produites par *S. aureus* par des techniques immunologiques de biologie moléculaire et l'évolution de leur production en présence de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum*.
- Approfondir des études sur la résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques utilisées en technologie alimentaire.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographies

- **Aggad H, Mahouz F, Ahmed y. Ammar et Kihal M.** (2009). Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Méd. Vét.* **160**, 590-595.
- **Agnès R.** (2013). Des nanoéponges luttent contre le staphylocoque doré. *Futura Science*, juin 2013 Issue. <http://www.futura-sciences.com/fr/sante/>.
- **Agnihotri MK, Prasad VS.** (1993). Biochemistry and processing of goat milk and milk products. *Small Ruminant Research.* **12**,151-170.
- **Allouche F, Hellal A et Laraba A.** (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie.* **3**, 13-20.
- **Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H et Kozaki S.** (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection.* **130** (1), 33-40.
- **Badis A, Laouabdia S, Guetarni D, Kihal D et Ouzrout R.**(2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle". *Sciences & Technologie.* **23**, 30-37.
- **Bekhouche F.** (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie. Université de Mentouri Constantine. Institut de la nutrition de l'alimentation et des technologies agro- alimentaires, Algérie, 149p.
- **Bennett RW.** (2001). *Staphylococcus aureus*. In *Guide to foodborne pathogens* Labbé. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA. pp. 201-220.
- **Bhunja AK.** (2008). *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Microbial Pathogens*. Edition: Springer Science, Business Media LLC. Springer. New York. 276p.
- **Bonnet F, Caron JD, Cavallo H, Chardon C, Chidiac P, Courvalin H, Drugeon L. Dubreuil V, Jarlier F, Jehl T, Lambert R, Leclercq MH. Nicolas-Chanoine P, Plesiat MC, Ploy C, Quentin CJ, Soussy E, Varon P et Weber.** (2012). Comité de l'antibiogramme De la société française de microbiologie. 59p.

- **Cayot P, Lorient D.** (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 363p.
- **Chamba JF, Duong C, Fazel A et Prost F.** (1994). Sélection des souches de bactéries lactiques. In bactéries lactiques. (Eds), Loriga, Paris, pp. 499-519.
- **Charlier C, Cretenet M, Even S et Le Loir Y.** (2009). Interaction between *Staphylococcus aureus* and lactic bacteria: an old story with new perspectives. Food Microbiol. **131** (1), 30-39.
- **David RB, Richard W. Castenholz GM, Donald J. Brenner NR, James T. Staley.** (2007). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edition : Springer, **2**(3).175p.
- **Delgado F, González-Crespo J, Cava R, Ramírez R.** (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. Food Chemistry. **160**, 1156–1163.
- **Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill FX, De Valk H, Vaillant V et Désenclos JC.** (2006). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. **52**, 418-422.
- **de Roissart HB et Luquet FM.** (1994). Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. Edition : Loriga. France. 590 p.
- **Dortu C et Thonart P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. **13**, 143-154.
- **Drider D et Préost H.** (2009). Bactérie lactique Physiologie Métabolisme Génomique et application industrielles. Edition : Economica. Paris. 320 - 324p.
- **Drouault S et Corthier G.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Vet. Res. **32** : 101-117
- **Elliot T.** (2001). Public health concerns. In: Applied dairy microbiology. Second Edition: ELMER H. MARTH, JAMES L.STEELE. (Eds), Marcel Dekker, Inc. New York. 690 p.
- **Elmoualdi L, Labioui H, Benzakour L, Ouhssine M et Yachioui M.** (2005). Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **147**, 7-8.
- **Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT.** (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. Veterinary Microbiology. **107**,295-299.

- **Ghobadi Dana M, Salmanian A, Yakhchali B et Rastegar F.** (2010). High folate production by naturally occurring *Lactobacillus* sp. with probiotics potential isolated from dairy products in Ilam and Lorestan provinces of Iran. *African Journal of Biotechnology*. **9**, 5383-5391.
- **Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ et Pitt T.** (2002). Determination the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: A Comparison of Multilocus Sequence Typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Randomly Amplified Polymorphie DNA Analysis, and Phage Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 4544-4546.
- **Guiroud JP.** (2003). *Microbiologie Alimentaire*. Edition: Dunod. Paris. 651p.
- **Guiroud JP et Galzy P.** (1998). *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Edition : Usine. Paris. 239p.
- **Guessas B et Kihal M.** (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African J. Biotechnol.* **3**, 339-342.
- **Grundmann H, Hori S, Enright MC, Webster C, Tami A, Feil EJ et Pitt T.** (2002). determination the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a Comparison Of Multilocus sequence Typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Randomly Amplified Polymorphie DNA Analysis, and Phage Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**, 4544-4546.
- **Göran Molin,** (2006). *Lactobacillus plantarum 299v*. **03-21**
- **Hogg S.** (2005). *Essential in microbiology*. Edition: John Wiley & Sons. England, 481p.
- **Idoui T.** (2008). *Les bactéries lactiques indigènes : Isolement, identification et propriétés technologiques. Effet probiotique chez le poulet de chair ISA15, le lapin de souche locale et le rat Wistar*. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 179p.
- **Idoui T et Karam NE.** (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's butter: isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. **59**, 361-367.
- **Idoui T, Boudjerda J, Leghouchi E et Karam NE.** (2009). Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. *Gr. Y. Aceites*. **60**, 177-183.

- **J.O.R.A.** (1998). Arrêté interministériel du (25 Ramadhan 1418 correspondant au) 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du (14 Safar 1415 correspondant au) 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires. du 27-05-1998 N°035, 7p.
  
- **Leroy, Moraud A.** (1992). *Sakacins in natural food microbial systems*. CRC press, London: 589-610.
  
- **Karam N.** (1995). Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : Etude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Oran, Algérie. 212p.
  
- **Kacem M et Karam NE.** (2006). Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the sahara (Algeria): Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Gr. Y. Aceites*. **57**, 198-204.
  
- **Kérouenton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A et De Buyser ML.** (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. **115**, 369-375.
  
- **Makhloufi k.** (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie en Microbiologie, Biochimie (Ecole doctorale iViv), Paris, 228p.
  
- **Millward B.** (2012). Fromage de chèvre frais. Fiche technique, Mai 2012 Issue. [www.belfoodservice.fr](http://www.belfoodservice.fr).
  
- **Mofredj A, Bahloul H, Chanut C.** (2007). *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste ? *Lactococcus lactis* : une bactérie opportuniste ? . *Médecine et Maladies Infectieuses* . **37**, 200-207.
  
- **Melo B, Gomes A, Monteiro M, Teixeira S, Evandro L, Pereira C, Estevez M.** (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology*. **50**, 538-544.
  
- **Morgane F, Bonnin V, Meyraud A, Mazuy C, Malereau M P, Perrin G et Vernozzy-Rozand C.** (2000). Comportement de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenèses* dans les fromages de chèvre au lait cru. *Renc. Rech. Ruminants*. **7**, 351-354.

- **Nascimento MS, Moreno I, kuaye AY.** (2008). Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology*. **67**(4), 352-357.
  
- **Novick RP.** (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*. **48**, 1429-1449.
  
- **Olaoye OA et Onilude AA.** (2009). Isolation and Biochemical Profiles of Numerous Strains of Lactic Acid Producing Bacteria from Various Parts of a Domestic West African Goat( *Capra Hircus*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **2**, 460-466.
- **Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F et Vilela CL.** (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*. **118**, 133-140.
- **Otero M, Nader M et Maria E.** (2005). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science*. **96**, 35–46.
  
- **Pandya A et Ghodke K.** (2007). Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*. **68**, 193–206.
- **Pilet M, Magras C et Federigh M.** (2005). Bactéries lactiques. In: bactériologie alimentaire (Federighi M). Edition: Economica, Paris, pp. 219-240.
- **Privat k et Thonart P.** (2011). Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **15**, 339-348.
- **Pujol-Dupuy C.** (2004). Accidents alimentaires d'origine bacterienne liés à la consommation de lait et produits laitiers. Thèse de Doctorat de Science vétérinaire Université Claude-Bernard. Ecole Nationale des Sciences Vétérinaires, Lyon, 245p
  
- **Rhiat M, Labioui H, Driouich A, Aouane M, Chbab Y, Driouich A, Mennane Z et Ouhssine M.** (2005). Étude bactériologique comparative des fromages frais marocains commercialisés (Mahlabats) et des fromages fabriqués au laboratoire. *Afrique Science*. **07**, 108 – 112.

- **Rodriguez E, Arqué S, Gaya P, Nunez M et Medina M.** (2000). Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing start cultures. *Milchwissenschaft.* **55**, 633-635.
- **Schillinger U et Lucke FK,** (1998). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat .*Appl. Environ. Microbiol.***55**, 1901-1906.
- **Schuk JP, Bouhallab S, Durupt D, Varielle P,Humbert JP et Mrin M.**(2004). Sechage des lactosérums et dérivés : rôle du lactose et de la dynamique de l'eau. *Dairy science and technologie* ,**84**.243-268
- **Smithers GW.** (2008). Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal.* **18**, 695–704.
- **Sottiez.** (1985).Produits dérivés des fabrications fromagères- extrait du lait et produits laitiers Tome 2. Chapitre 5. Collection Tec et Doc. Apria 1985, pp. 357-392.
- **Streit F, Corrieu G. et Béal C.** (2007). Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* *CFII. J. Biotechnol.* **128**, 659-667.
- Sutra L. (1998). *Staphylococcus aureus*. In : Manuel de bactériologie alimentaire. Sutra, L, Federighi, M, et Jouve, J. L. (Eds), Poly tech. 308p.
- **Tabak S et Bensoltane A.** (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. *Nature & Technologie.* **6**, 71-79.
- **Taponen S et Pyorala S.** (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*? . *Veterinary Microbiology.* **134**, 29-36.
- **Todd EC, Greig JD, Bartleson CA et Michaels BS.** (2009). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *Journal of Food Protection.* **72**, 202-19.
- **Tamime A.** (2002). Microbiology of starter cultures. In: *Dairy microbiology handbook* (Robinson R.K.). (Eds), John Wiley and Sons, Inc, New York, pp. 261-366.

- **Ukeyima MT, Enujiugha VN et Sanni TA.** (2010). Current Applications of probiotic foods in Africa. *African Journal of Biotechnology*. 4 Suppl 9: S394-401.
  
- **Vandenbergh PA.** (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**, 221-238.
  
- **Zadi H (1998).** Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius* : étude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologiques, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Constantine, Algérie. 205p.
  
- **Zeller B. (2005).** Le fromage de chèvre: spécificité microbiologique et technologique. Thèse pour obtenir de grade de docteur vétérinaire Université Paul-Sabatier, Toulouse, 78p.



# ***Annexes***

## ANNEXE I

### Composition des milieux de culture

**Tableau I : Bouillon nutritif (Guiraud, 1998)**

composant	Quantité
Extrait de viande	1g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml
pH=7	

La composition de la **gélose nutritive** : il s'agit du milieu précédent plus 15g d'agar.

**Tableau II : Gélose Chapman (Guiraud, 1998)**

Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
peptone	10g
manitole	10g
Chlorure de sodium	75g
Rouge de phénole	0,025g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH=7,4 Autoclaver à 120°C /20 min	

**Tableau III : Eaux physiologique (Guiraud, 1998).**

Composant	Quantité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml
pH=7,2	

**Tableau IV : Gélose EMB (Guiraud, 1998)**

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Peptone pancréatique de gélatine	10,0 g
Lactose	10,0 g
Phosphate dipotassique	2,0 g
Eosine Y	0,4 g
Bleu de méthylène	65,0 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	1000 ml
pH=7,0 ± 0,2	

**Tableau V : Milieu de Giolitti et Cantoni (Guiraud, 1998)**

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Tryptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de lithium	5 g
Mannitol	20 g
Chlorure de sodium	5 g
Glycine	1,2 g
Pyruvate de sodium	3 g
Eau distillée	1000 ml
pH à 6,9.	

**Tableau VI : Milieu MRS (Guiraud, 1998).**

<b>Composants</b>	<b>Quantité</b>
Peptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate bipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0.2g
Sulfate de manganèse, 4 H <sub>2</sub> O	0.5g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH= 6.5	

**Tableau VII : Gélose Mueller-Hinton (Guiraud, 1998).**

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar	17 g
Eau désilé	1000ml

**Tableau VIII : Gélose SS (Guiraud, 1998).**

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Peptone pancréatique de viande	5,0 g
Extrait de viande	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sels biliaires	8,5 g
Citrate de sodium	10,0 g
Thiosulfate de sodium	8,5 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,0 g
Rouge neutre	25,0 mg
Vert brillant	0,33 mg
Agar agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	1000 ml
pH=7,0	

**Tableau IX : Violet Red Bile Glucose Agar (gélose VRBG) (Guiraud, 1998).**

<b>Composant</b>	<b>Quantité</b>
Peptone (peptone de viande pancréatique et papainique)	7.0 g
Extrait de levure	3.0 g
D-glucose	10.0 g
Sels biliaires (sels biliaires purifiés)	1.5 g
NaCl	5.0 g
Rouge neutre	0.03 g
Violet cristallisé	0.002 g
Agar-agar	15g
Eau	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

## ANNEXE II : Appareillage

- Verrerie usuelle (boites pétri, erlenmeyers, béchers, fioles, pipettes pasteur, tube à essais, flacon burettes, entonnoirs, ...).
- Autoclave (Omron, E5C4, H2C)
- Bain Marie (Raypa) ;
- Balance (Sartorius) ;
- Compteur de colonies (Suntex) ;
- Congelateur (Samsung);
- Etuve à 30 et 44°C (Memmert) ;
- Etuve à 30°C (melaz);
- Four pasteur (Heraeus);
- Four Pasteur (Controls) ;
- Micropipettes (Accumax) ;
- Microscope optique (Zein) ;
- pH mètre (Hanna) ;
- Réfrigérateur (ENIEM) ;
- Vortex électrique (VELP) ;
- Disques d'antibiotiques : Spiramycine (HMEDIA), Cefalixine, Oxacilline, Vanomycine et Cefoxitine (BIOANALYSE).

### Produits chimiques et réactifs

- Les colorants : Violet de Gentiane, fuschine, bleu de méthylène, phénolphtaléine à 1%
- Les acides et bases : La soude dornic N/9 .
- Alcool et autres : Ethanol, lugol, eau oxygénée.

### Tampons

- Tampon à pH =4.
- Tampon à pH=7.

### La présure (Caglio-Liquido)

## ANNEXE III : Résultats

**Tableau I :** pH des laitsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

Temps (h)	0	2	4	24
Souches				
<i>Lb. plantarum</i>	6,32	6,25	6,19	5,97
<i>Lc. lactis</i>	6,3	6,24	6,13	5,85
<i>Lb. plantarum+ Lc. lactis</i>	6,33	6,3	6,3	6,2
<i>S.aureus</i>	6,4	6,43	6,47	6,49

**Tableau II :** Acidité Dornic des laitsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

Temps (h)	0	2	4	24
Souches				
<i>Lb. plantarum</i>	20	21	21,5	26
<i>Lc. lactis</i>	20	22	24	33
<i>Lb. plantarum + Lc. lactis</i>	20	19	19	22
<i>S.aureus</i>	22	20,5	20	18

**Tableau III :** Croissance des souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus* dans le lait stérile de chèvre

Temps (h)	0	2	4	24
Souches				
<i>Lb. plantarum</i>	5,69	6,17	7,25	8,08
<i>Lc. lactis</i>	6	6,46	6,53	8
<i>Lb. plantarum + Lc. lactis</i>	6,41	6,74	6,79	8,99
<i>S.aureus</i>	4	4,69	5,32	7

**Tableau IV :** Croissance des souches *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus* dans le lactosérum.

Temps(h)	0	2	4	24
Souches				
<i>Lc.lactis</i>	7,23	7,38	7,53	8,87
<i>Lb. Plantarum</i>	6,1	7,35	8,38	10,23
<i>LC.lactis+Lb.plantarum</i>	5,98	7,25	7,3	10,17
<i>S.aureus</i>	3,3	4,3	5,9	8,37

**Tableau V :** pH des lactosérumsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus*.

Temps(h)	0	2	4	24
<i>Lc.lactis</i>	4,54	4,55	4,58	4,55
<i>Lb. Plantarum</i>	4,43	4,43	4,4	4,22
<i>S.aureus</i>	4,64	4,73	4,77	4,64
<i>LC.lactis+Lb.plantarum</i>	4,46	4,45	4,45	4,15

**Tableau VI :** Acidité Dornic des lactosérumsensemencés avec les souches *Lb. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis+Lb. plantarum* et *S. aureus* dans le lactosérum

Temps(h)	0	2	4	24
<i>Lc. lactis</i>	60	60	70	100
<i>Lb. Plantarum</i>	57	57	59	70
<i>S. aureus</i>	60	58,5	58	59
<i>LC. lactis+Lb. plantarum</i>	56	58	59	72

**Tableau VII:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage au de lait de chèvre stérile non conservé dans le lactosérum

Temps (Jours)	3	7	14	21
<i>Lb .plantarum+ S. aureus</i>	7,3	7,18	6,82	4,07
<i>Lc. lactis+ S. aureus</i>	7,99	6,39	6,89	4,02
<i>Lb. plantarum+Lc. lactis+S. aureus</i>	8,33	6,3	4,3	5,95
<i>S. aureus</i>	8	8,02	8,14	8,47

**Tableau VIII:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage au lait cru de chèvre non conservé dans le lactosérum

Temps (jours) \ Fromage	3	7	14	21
<i>Lb. plantarum</i>	8,95	7	6,11	4,94
<i>Lc. lactis</i>	8,72	7,3	6,3	5,47
<i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i>	8,33	7,84	7,74	5,95
<i>S. aureus</i>	8,09	8,47	8,71	8,91

**Tableau IX:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage frais au lait cru de chèvre conservé dans le lactosérum

Fromage \ Temps (jours)	<i>Lb. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	<i>Lc. lactis</i> + <i>S. aureus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> + <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
7	8,77	7,34	7,54	8,27
14	7	7,3	7,2	8,4
21	4,04	6,8	4,32	8,5

**Tableau X:** Résultats des dénombrements de *S. aureus* dans le fromage frais au lait stérilisé de chèvre conservé dans le lactosérum

Fromage \ Temps (jours)	<i>Lb. plantarum</i> + <i>S. aureus</i>	<i>Lc. lactis</i> + <i>S. aureus</i>	<i>Lb. plantarum</i> + <i>Lc. lactis</i> + <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
7	8,77	7,6	8,2	8,1
14	7,36	7,04	7,5	8,15
21	4,11	6,99	4,3	8,20

**Tableau XI :** Résultats de l'analyse microbiologique du lait (UFC/ ml).

Germes	Nombre (UFC/ml)
-germes aérobies à 30°C	10 <sup>9</sup>
- Coliformes fécaux	Absence
- <i>Staphylococcus aureus</i>	10 <sup>3</sup>
- flore lactique	1,6.10 <sup>8</sup>
-Coliforme totaux	10 <sup>3</sup>
- <i>Salmonella</i>	Absence
- <i>Enterocoqus</i>	10 <sup>3</sup>

## **ANNEXE IV : Coloration de Gram et test de catalase**

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

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

Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

### **Test de catalase**

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase.

**Résumé:** Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation et la bio conservation des aliments grâce à la production des substances inhibant certaines souches pathogènes.

Cette étude avait pour objectif de mettre en évidence le pouvoir antagoniste de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* à l'égard de *S. aureus* et de démontrer son intérêt dans la production de fromage frais au lait cru de chèvre conservé ou non dans le lactosérum. Le test des spots a été réalisé pour ces deux souches, ce test a montré un effet inhibiteur important de *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* envers *S. aureus*, les diamètres d'inhibitions mesurés étaient respectivement de 16mm et 19mm. Un fromage au lait cru et stérile de chèvre a été mis au point au laboratoire, 16 échantillons ont été réalisés et inoculés avec des cultures pure *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* ou mixte et volontairement contaminé avec *S. aureus*, un témoin est également réalisé. L'évolution du *S. aureus* dans les fromages a été suivie pendant 21 jours de stockage à 4°C. Les résultats obtenus, ont montré que la croissance de *S. aureus* est significativement réduite lors du stockage. Dans les fromages conservés dans le lactosérum, *Lb. plantarum* à un effet inhibiteur plus important par rapport à *Lc. lactis* et la culture mixte, la réduction du nombre de *S. aureus* était de 4Log dans le fromage renfermant *Lb. plantarum* et le fromage inoculé avec la culture mixte et de 2Log dans le fromage inoculé avec *Lc. lactis*. Dans les fromages non conservés dans le lactosérum *Lc. lactis* et *Lb. plantarum* en culture mixte ou pure ont le même effet inhibiteur, la réduction du nombre de *S. aureus* était de 4log par rapport au fromage témoin.

**Mots clés:** *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *S. aureus*, fromage au lait de chèvre, activité antimicrobienne, lactosérum.

**Abstract:** Lactic acid bacteria are used in the fermentation and preservation of food through the production of substances that inhibit certain pathogenic strains.

This study has to aim to highlight the antagonistic power and *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* against *S. aureus* and demonstrate an interest in the production of fresh cheese made from raw goat milk preserved or not whey. The test spot was made for these two strains, the test showed a significant inhibitory effect of *Lc. lactis* and *Lb. plantarum* to *S. aureus*, the diameters of inhibition measured were 16mm and 19mm respectively. Cheese made from raw goat milk and sterile was developed in the laboratory, 16 samples were made and inoculated with pure cultures *Lc. lactis*, *Lb. plantarum* or mixed and deliberately contaminated with *S. aureus*, a witness is also performed. The evolution of *S. aureus* in cheeses was followed for 21 days of storage at 4 ° C. The results showed that the growth of *S. aureus* was significantly reduced during storage. In cheese whey in the *Lb. plantarum* stored has a greater inhibiting effect compared to *Lc. lactis* and the mixed culture, the reduction in the number of *S. aureus* was 4Log in cheese containing *Lb. plantarum* and cheese inoculated with the mixed culture and 2Log in cheese inoculated with *Lc. lactis*. In cheese whey not kept in *Lc. lactis* and *Lb. plantarum* mixed or pure culture have the same inhibitory effect; reducing the number of *S. aureus* was 4log compared to witness cheese.

**Keywords:** *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *S. aureus*, goat's milk cheese, antimicrobial activity, whey.