

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abderrahmane Mira de Bejaïa**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Microbiologie**

# **Mémoire de fin de cycle**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie Appliquée**

**Option : Microbiologie Alimentaire et Santé**

**Impact de trois types de lait (vache, chèvre et  
écrémé) sur le pouvoir acidifiant et anti-  
Staphylococcus aureus de Leuconostoc  
mesenteroides ssp mesenteroides**

**Présenté par :**

M<sup>elle</sup> ABDELFETTAH Narimane

M<sup>elle</sup> SAIDENE Amel

**Membre de Jury :**

Président : M<sup>r</sup> SADOUN

Promotrice : M<sup>me</sup> FARADJI

Examinatrice : M<sup>me</sup> BENACHOUR

Examineur : M<sup>r</sup> BENDJEDOU

**Promotion 2012-2013**



# Remerciements



*Nous remercions, Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce projet.*



*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre promotrice M<sup>me</sup> **Faradji-Hamma Samia**, pour sa qualité d'enseignement, pour le suivi qu'elle nous a accordé au déroulement de ce mémoire, nous vous sommes très reconnaissantes de nous avoir encadrées, d'avoir dirigé ce travail et d'avoir veillé à son élaboration en ne ménageant aucunement votre temps et vos conseils.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à M<sup>r</sup> **Sadoun** qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également M<sup>me</sup> **Benachour** et M<sup>r</sup> **Bendjedou** d'avoir accepté d'examiner cette étude.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à M<sup>elle</sup> **Cherchour Salima** chef de département de contrôle qualité sucre de l'entreprise **Cevital**, M<sup>r</sup> **Saidene Mouhamed Fouad** ingénieur en informatique développeur web et M<sup>r</sup> **Medjber Halim** chef de service de laboratoire de l'entreprise **Tchin-lait Candia** pour leurs aides et leurs conseils précieux,*

*Nous remercions également tous nos camarades du laboratoire*







# Remerciements



*Nous remercions, Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce projet.*



*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre promotrice **M<sup>me</sup> Faradji-Hamma Samia**, pour sa qualité d'enseignement, pour le suivi qu'elle nous a accordé au déroulement de ce mémoire, nous vous sommes très reconnaissantes de nous avoir encadrées, d'avoir dirigé ce travail et d'avoir veillé à son élaboration en ne ménageant aucunement votre temps et vos conseils.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **M<sup>r</sup> Sadoun** qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également **M<sup>me</sup> Ben Achour** et **M<sup>r</sup> Bendjedou** d'avoir accepté d'examiner cette étude.*


*Nos vifs remerciements s'adressent à **M<sup>elle</sup> Cherchour Salima** chef de département de contrôle qualité sucre de l'entreprise **Ce-vital**, **M<sup>r</sup> Saidene Mouhamed Fouad** ingénieur en informatique développeur web et **M<sup>r</sup> Medjber Halim** chef de service de laboratoire de l'entreprise **Tchin-lait Candia** pour leurs aides et leurs conseils précieux*

*Nous remercions également tous nos camarades de laboratoire **LSMA**, et précisément **Yasmine** et **Fatima**.*






# Dédicaces



*Je tiens vraiment, à dédier ce travail en signe de respect et de reconnaissance à vous, mes très chers parents, pour tous vos sacrifices, vos encouragements et votre soutien tout au long de mes études. Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci que Dieu vous protège !*



*A ma Grand-Mère Tassadit "Memesse" que j'aime beaucoup*

*A mon aimable Grand-Père Rabeih*

*A mon cher frère Yanis et Mon adorable petite sœur Melissa*

*A mes chères tantes : Hassina et sa famille, Nabila, Salima, Sabiha,  
Nassima et sa famille*

*A mon adorable oncle Mohamed et son épouse Dalia*

*A toute la famille ABDELFFETAH et CHERCHOUR*

*A mes chères amies : Rosa, Ibtissem, Fayza*

*A mon binôme Amel*

*A tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pour la réalisation de ce modeste travail et à tous ceux qui me sont chers*

*« Narimane »*





# Dédicaces



*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je  
dédie ce modeste travail*

*A mes chers, respectueux et magnifiques parents, qui m'ont soutenu  
tout au long de ma vie, jamais je ne pourrais m'exprimer quant aux  
sacrifices et dévouement que vous consacrés à mon éducation et mes  
études. Tous les mots expressifs restent faibles pour énoncer ma  
gratitude hautement profonde. Que Dieu vous protège et vous garde.*

*A mes chers et adorables frères Yanis, Kamel et Walid.*

*A mes très chers grands parents, mes oncles et mes tantes ainsi qu'à  
toutes mes cousines, mes cousins et toute la famille Saidene*

*A mon binôme Narimane*

*A mes chers amis : Hakima, Assia, Mérieme, Kahina, Malika, Faten,  
Bania, Naziha, Narimane et Kahina*

*A toute la promotion Microbiologie Alimentaire et Santé et toute  
l'équipe du laboratoire de Microbiologie du lait et Probiotiques.*

*Enfin, je dédie ce travail à tous mes amis que je n'ai pas cités et à tous  
ceux qui me connaissent et à toutes les personnes qui m'ont encouragé  
et aidé au long de mes études et de ma vie.*

*« Amel »*



## Liste des abréviations

**ADMI** : American Dry Milk

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**A<sub>w</sub>**: Activités de l'eau

**BCPL**: Bouillon Lactose au Pourpre Bromocrésol

**BD** : Levains qui contiennent à la fois des *Leuconostocs* et *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme

**BN** : Bouillon Nutritif

**°C** : Degré Celsius

**C<sub>4</sub>** : Carbone 4

**Ca** : Calcium

**CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de Carbone

**°D** : Degré Dornic

**EMB**: Eosine Méthylène Blue

**ES**: Extrait Sec

**ESD**: Extrait Sec Dégraissé

**EPS** : Exopolysaccharide

**ESP**: Point de Congélation

**FTAM** : Flore Totale Aérobie Mésophile

**GC**: Guanine et Cytosine

**GC**: Giolitti Cantoni

**GN** : Gélose Nutritive

**INRA**: Institut National de Recherche Agronomique

**J.O.R.A** : Journal Officiel de la République Algérienne

**K**: potassium

**K<sub>m</sub>** : Constante de Michaelis

**Lact**: Lactose

**Lc** : *Lactococcus*

**Ln** : *Leuconostoc*

**Mg**: Magnésium

**MG**: Matières Grasses

**Mn<sup>2+</sup>**: Manganèse



**MP:** Matières Protéiques  
**MRS:** Man Rogasa and Sharpe  
**MGLA :** Matière Grasse Laitière Anhydre  
**Mol :** Mole  
**Na:** sodium  
**NaCl:** Chlorure de sodium  
**NaOH:** L'hydroxyde de sodium  
**NPP:** Nombre Le Plus Probable  
**P:** Phosphate  
**PCA:** Plate Count Agar  
**pH :** potentiel Hydrogène  
**Ppm:** Partie par million  
**S:** *Staphylococcus*  
**SS:** Salmonella- Shigella  
**Str :** *Streptococcus*  
**Sp :** Espèce  
**Ssp :** Sous Espèce  
**UFC :** Unité Formant Colonies  
**VRBG:** Violet Red Bile Glucose Agar  
**WPNI:** Whey Protein Nitrogen Index

## Listes des figures

<b>Figure 1 :</b> Arbre phylogénétique des bactéries lactiques .....	10
<b>Figure 2 :</b> Fixation des <i>Leuconostocs</i> sur les moules en grés-vernisé (Examen en microscopie électronique de balayage (Examen en microscopie électronique de balayage (Grossissement 11500 fois) .....	11
<b>Figure 3 :</b> Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de <i>Ln mesenteroides</i> .....	13
<b>Figure 4 :</b> Revivification et vérification de la pureté des souches tests .....	18
<b>Figure 5 :</b> pH mètre-portable HANNA- HI 99161 .....	20
<b>Figure 6 :</b> Méthodologie de mesure de l'acidité Dornic du lait .....	21
<b>Figure 7 :</b> MilkoScan Minor .....	22
<b>Figure 8 :</b> Centrifugeuse FUNK-GERBER pour le lait .....	23
<b>Figure 9 :</b> Dénombrement des coliformes totaux .....	25
<b>Figure 10 :</b> Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
<b>Figure 11 :</b> Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche lactique ( <i>Ln mesenteroides</i> ) .....	31
<b>Figure 12 :</b> Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche cible ( <i>S aureus</i> ) .....	33
<b>Figure 13 :</b> Etude de l'activité antagoniste de <i>Ln mesenteroides</i> dans les différents types du lait .....	35
<b>Figure 14 :</b> Aspect des colonies sur gélose MRS.....	36
<b>Figure 15 :</b> Test catalase.....	36
<b>Figure 16 :</b> Aspect des colonies sur gélose Chapman.....	36
<b>Figure 17 :</b> Test catalase.....	36
<b>Figure 18 :</b> Résultats de l'analyse microbiologique du lait de vache .....	39
<b>Figure 19 :</b> Résultats de l'analyse microbiologique du lait de chèvre.....	39
<b>Figure 20 :</b> Aspect de la FTAM de lait de vache sur gélose PCA .....	40
<b>Figure 21:</b> Aspect de la FTAM de lait de chèvre sur gélose PCA .....	40
<b>Figure 22 :</b> Aspect des colonies des Entérobactéries sur milieu VRBG.....	41
<b>Figure 23 :</b> Résultats de recherche de <i>S. aureus</i> dans le lait de vache... ..	42
<b>Figure 24 :</b> Test des spots .....	44
<b>Figure 25 :</b> Cinétique de croissance de <i>Ln mesenteroides ssp mesenteroides</i> dans les	

différents types du lait .....	49
<b>Figure 26</b> : Résultats de la mesure du pH de la souche <i>Ln. mesenteroides ssp</i> <i>mesenteroides</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	47
<b>Figure 27</b> : Résultats de la mesure de l'acidité Dornic de la souche souche <i>Ln.</i> <i>mesenteroides ssp</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	47
<b>Figure 28</b> : Cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	48
<b>Figure 29</b> : Résultats de la mesure du pH de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	48
<b>Figure 30</b> : Résultats de la mesure de l'acidité Dornic de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	47
<b>Figure 31</b> : Cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> en culture mixte avec <i>Ln mesenteroides</i> <i>ssp mesenteroides</i> dans les différents types du lait .....	50
<b>Figure 32</b> : Evolution du pH de la culture mixte de <i>S. aureus</i> avec <i>Ln mesenteroides ssp</i> <i>mesenteroides</i> dans les différents types du lait .....	50
<b>Figure 33</b> : Evolution de l'acidité de la culture mixte de <i>S. aureus</i> avec <i>Ln mesenteroides</i> <i>ssp mesenteroides</i> dans les différents types du lait .....	51

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Caractères physico-chimiques du lait cru de vache et de chèvre .....	5
<b>Tableau II</b> : Ordre de grandeurs moyens (UFC/ml) de quelques groupes microbiens couramment dénombrés dans les laits crus de vaches et de chèvres .....	7
<b>Tableau III</b> : Mesure du pH et de l'acidité Dornic .....	37
<b>Tableau IV</b> : Résultats d'analyse de divers paramètres physico-chimique des trois différents types du lait .....	37
<b>Tableau V</b> : Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache et chèvre utilisés .....	40
<b>Tableau VI</b> : Résultats des tests de spots.....	44
<b>Tableau VII</b> : Résultats de la standardisation des souches étudiées .....	45



# Liste des tableaux en annexes

## Annexe I : Composition des milieux de culture

### Annexe II : Tableaux

- Tableau I :** Composition comparée des laits de vache et de chèvre
- Tableau II :** Composition moyenne du lait écrémé en poudre
- Tableau III :** Les caractères spécifiques de lait en poudre écrémé à consommation humaine
- Tableau IV :** Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Leuconostoc*
- Tableau V :** Exemples de bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des aliments

### Annexe III : Coloration de Gram

### Annexe IV : Résultats

- Tableau I :** Résultats de dénombrement de la culture pure de *Leuconostocs mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types de lait
- Tableau II :** Résultats de dénombrement de la culture pure de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait
- Tableau III :** Résultats de dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans la culture mixte dans les différents types de lait
- Tableau IV :** Evolution du pH et d'acidité Dornic de *Leuconostocs mesenteroides ssp mesenteroides* en culture pure dans les différents types de lait
- Tableau V :** Evolution du pH et d'acidité Dornic de *Staphylococcus aureus* en culture pure dans les différents types de lait.
- Tableau VI :** Evolution du pH et d'acidité Dornic de la culture mixte de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait.

### Annexes V : Résultats statistiques

- Tableau I :** Analyse de la variance de log du nombre de *Leuconostoc mesenteroides* dans la culture pure
- Tableau II :** Analyse de la variance de log du nombre de *S. aureus* dans la culture pure
- Tableau III :** Analyse de la variance de log du nombre de *staphylococcus aureus* dans la

culture mixte

- Tableau IV :** Analyse de la variance du pH de la culture pure de *Ln. mesenteroides*
- Tableau V :** analyse de la variance du pH de la culture pure de *staphylococcus aureus*
- Tableau VI :** analyse de la variance du pH de la culture mixte
- Tableau VII :** analyse de la variance du l'acidité Dornic de la culture pure de *Leuconostoc mesenteroides*
- Tableau VIII :** analyse de la variance d'acidité Dornic dans la culture pure de *Staphylococcus aureus*
- Tableau IX :** analyse de la variance de la culture mixte de *Staphylococcus aureus*

**Annexe VI :** Table de Mac Grady

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## Synthèse bibliographique

I- Généralités sur les laits .....	3
I-1- Définition du lait cru .....	3
I-1-1- Lait cru de vache .....	3
I-1-2- Lait cru de chèvre .....	3
I-2- Définition du lait en poudre .....	4
I-3- Constituants physico-chimiques comparé des laits de vache et de chèvre.....	4
I-3-1- Composition moyenne du lait de vache .....	5
I-3-2- Composition moyenne du lait de chèvre .....	6
I-4- Constituants physico-chimiques du lait écrémé en poudre .....	6
I-5- Microbiologie du lait .....	6
I-6- Contamination du lait par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
II- Les bactéries lactiques .....	8
II-1- Définition et caractéristiques principales des bactéries lactiques .....	8
II-2- Taxonomie et classification des bactéries lactiques .....	9
II-3- Le genre <i>Leuconostoc</i> .....	10
II-3-1- Définition et caractérisation .....	10
II-3-2- Habitat des <i>Leuconostocs</i> .....	11
II-3-3- Les <i>Leuconostocs</i> du lait .....	12
II-4- Rôles technologiques des <i>Leuconostocs</i> .....	12
II-4-1- Utilisation des <i>Leuconostocs</i> pour améliorer la structure des fromages .....	12
II-4-2- Utilisation des <i>Leuconostocs</i> comme levains d'arôme .....	13
II-4-3- Utilisation des <i>Leuconostocs</i> pour améliorer certains défauts de goût .....	14
II-5- Intérêt des <i>Leuconostocs</i> dans les aliments fonctionnels .....	14

II-5-1-	Leuconostocs comme probiotique potentiel .....	14
II-5-2-	Production de glucane-saccharase .....	15
II-5-3-	Production de polysaccharides et de mannitol .....	15
II-6-	Effet antibactérien des espèces du genre <i>Leuconostoc</i> .....	15
II-6-1-	Production de métabolites inhibiteurs .....	16

## **Partie pratique**

### **Chapitre I : Matériels et méthodes**

I-1-	Lieu de réalisation du travail .....	17
I-2-	Origines des souches .....	17
I-3-	Revivification et vérification de la pureté des souches de <i>Leuconostoc</i> testées .....	17
I-4-	Revivification et vérification de la pureté de la souche cible .....	18
I-5-	Echantillons du lait.....	19
I-5-1-	Prélèvement et transport des échantillons du lait .....	19
I-6-	Analyses physico-chimiques des échantillons du lait .....	20
I-6-1-	Mesure du pH .....	20
I-6-2-	Mesure de l'acidité Dornic .....	20
I-6-3-	Mesure de divers paramètres physico-chimiques par l'appareil MilcoScan Minor.....	21
I-6-4-	Mode d'emploi du MilkoScan Minor .....	22
I-6-5-	Détermination du taux de matière grasse par la méthode de Gerber .....	22
I-7-	Analyse microbiologique des échantillons de lait cru .....	23
I-7-1-	Préparation des dilutions .....	24
I-7-2-	Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) .....	24
I-7-3-	Dénombrement des coliformes totaux .....	25
I-7-4-	Dénombrement des Streptocoques totaux et fécaux .....	26
I-7-5-	Dénombrement des Entérobactéries .....	26
I-7-6-	Dénombrement des levures et moisissures .....	26
I-7-7-	Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
I-7-8-	Dénombrement des Salmonelles .....	27
I-7-9-	Dénombrement des bactéries lactiques .....	27
I-8-	Stérilisation du lait .....	27
I-9-	Mise en évidence de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des souches de <i>Leuconostocs</i> .....	28



I-9-1- Test des spots .....	28
I-10- Standardisation de l'inoculum de la souche lactique sélectionnée dans les différents types de lait.....	28
I-11- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche lactique sélectionnée dans les différents types du lait .....	29
I-12- Standardisation de l'inoculum de la souche cible ( <i>S aureus</i> ) dans les différents types de lait .....	29
I-13- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche cible ( <i>S aureus</i> ) dans les différents types de lait .....	32
I-14- Etude de l'effet antagoniste de <i>Ln mesenteroides ssp mesenteroides</i> à l'égard de <i>S. aureus</i> en culture mixte dans les différents types de lait .....	34
I-15- Etude statistique .....	34

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

II-1- Vérification de la pureté des souches <i>Leuconostoc</i> testées .....	36
II-2- Vérification de la pureté de la souche cible <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
II-3- Evaluation de la qualité hygiénique des échantillons de lait .....	37
II-3-1- Mesure du pH et de l'acidité titrable .....	37
II-3-2- Mesure de divers paramètres physico-chimiques .....	37
II-3-3- Analyse microbiologique des échantillons de lait cru de vache et de chèvre..	38
II-4- Activité antibactérienne <i>in vitro</i> des souches de <i>Leuconostoc</i> .....	43
II-4-1- Test de spot .....	43
II-5- Standardisation des inoculas bactériens .....	45
II-6- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i> dans les différents types du lait .....	45
II-7- Etude de la cinétique de croissance de <i>S. aureus</i> en culture pure dans les différents types du lait .....	48
II-8- Etude de l'antagonisme de <i>Ln. mesenteroides ssp mesenteroides</i> envers <i>S. aureus</i> dans les différents types de lait .....	50

<b>Conclusion .....</b>	<b>54</b>
-------------------------	-----------

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# Introduction

Le lait est un aliment biologique qui présente un intérêt nutritionnel pour l'homme, et dont la production organisée remonte à plus de dix mille ans. Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent milieu de culture très enrichi, permettant ainsi le développement de plusieurs microorganismes (**Faye et al, 2002 ; Guiraud, 2003**).

La contamination microbienne des laits constitue une obsession permanente dans les pays en développement, les bactéries comme *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum* et *Staphylococcus aureus* sont les causes les plus fréquentes des maladies transmises par le lait. Cela met en obligation un contrôle microbiologique rigoureux (**Delgado et al, 1999**).

La microflore microbienne du lait cru est composée essentiellement de bactéries lactiques, ces bactéries sont utilisées depuis fort longtemps dans les procédés de fermentation alimentaire (lait fermenté, fromage). Elles participent aux propriétés organoleptiques ainsi qu'à une meilleure conservation du produit. En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes telles que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le diacétyl. Elles jouent un important rôle hygiénique en abaissant le pH et en produisant d'autres substances inhibitrices tels que le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines qui empêchent le développement de bactéries indésirables (**Hécharde, 1993 ; Zarour et al, 2012**).

Parmi les bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries hétérofermentaires du genre *Leuconostoc*, qui sont considérées comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des ouvertures dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort. Les espèces de *Leuconostoc* sp peuvent être utilisées en industries agro-alimentaire pour leur capacité à produire des composés aromatiques (diacétyl et acétoïne) et d'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol contribuent à la texture et à la saveur des produits laitiers frais (beurre, fromage frais, crème fraîche) (**Dridier et Prévost, 2009 ; Zarour et al, 2012**).

En Algérie, 18% des cas d'intoxications alimentaires recensés sont dus à la consommation de produits laitiers (**Madi et al, 2011**). L'espèce bactérienne la plus fréquemment incriminée dans les toxi-infections impliquant le lait cru et les produits laitiers

demeure *Staphylococcus aureus* (De Buyser et al, 2001). Les quantités de *Staphylococcus aureus* excrétées dans le lait des quartiers infectés peuvent être considérables, de  $10^3$  à  $10^5$  bactéries/ml en moyenne, mais pouvant atteindre  $10^6$  bactéries/ml en cas d'infection sub-clinique, et jusqu'à  $10^8$  bactéries/ml en cas d'infection clinique (FIL, 1991). Dans un élevage, la liaison entre la prévalence des infections à *Staphylococcus aureus* et le niveau de contamination du lait de troupeau est très significative ; lorsque ce niveau dépasse régulièrement  $10^3$  bactéries /ml, on peut considérer qu'en moyenne plus de 25% des vaches ou des chèvres sont infectées (Ménard et Heuchel, 1994). D'autre part, la colonisation de la peau et l'infection des lésions superficielles des trayons par *Staphylococcus aureus* constituent également des sources de contamination du lait, dont l'importance quantitative est mal connue.

De nombreuses études ont fait l'objet de recherches sur l'effet inhibiteur des bactéries lactiques à l'égard de *Staphylococcus aureus*. Cependant peu d'étude semblent s'être intéressées à l'influence des types de laits sur l'activité antibactérienne de *Leuconostoc mesenteroides* à l'égard de *Staphylococcus aureus*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude, qui a pour objectif d'étudier la croissance de la souche test (*Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides*) ainsi que son pouvoir acidifiant et son activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait (lait de vache et de chèvre) récoltés dans la région de Bejaïa, et le lait écrémé reconstitué à 10% par la poudre de lait écrémé fournis par la laiterie Candia.



## **I- Généralités sur le lait**

### **I-1- Définition du lait cru**

Le lait est un liquide alimentaire opaque, blanc mat légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition, par la glande mammaire des animaux mammifères femelles pour nourrir leur nouveau-né (**Larousse agricole, 2002**).

Le décret du 25 mars 1924 portant application de la loi du 1<sup>er</sup> août 1905 en ce qui concerne le lait et les produits de la laiterie précise : « Le mot lait, sans indication de l'espèce, désigne en France le lait de vache ; il 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. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait », suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient : lait de chèvre, lait de brebis, etc. »

#### **I-1-1- Lait cru de vache**

La vache assure de loin la plus grande part de la production mondiale de lait (90%), même en pays tropicaux (70%). Ce lait est de tous le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes. Il est aussi le produit laitier le plus consommé et étudié en nutrition humaine ;

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre (**Courtet Leymarios, 2010**).

#### **I-1-2- Lait cru de chèvre**

En Algérie, la production de lait de chèvre a longtemps été marginalisée, développée à l'échelle familiale dans les régions montagneuses de la Kabylie, et consommé à l'état cru ou fermenté. Le lait de chèvre est un aliment de grande importance à l'échelle mondiale, il peut constituer une profitable alternative au lait de vache. Les produits au lait de chèvre suscitent l'intérêt des consommateurs du fait qu'ils accomplissent l'une des trois demandes suivantes : la

consommation ménagère << la chèvre est la vache du pauvre >>. Un intérêt particulier est donné aux produits à base de lait de chèvre spécialement le fromage et le yaourt vu leurs goût caractéristique ; leurs propriétés nutritives particulières et l'augmentation de leurs rentabilité et le troisième aspect de la demande qui dérive de l'affliction des personnes présentant des allergies au lait de vache (**Haenlein, 2004**).

### **I-2- Définition du lait en poudre**

Le lait en poudre est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini. On distingue les laits en poudre suivants:

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé: lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.
- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses (**GEMRCN, 2009**).

### **I-3- Constituants physico-chimique du lait de vache et de chèvre**

D'un point de vue physique (tableau I), le lait constitue un système complexe. Il contient les différents groupes de nutriments. Les substances organiques se répartissent en éléments bâtisseurs, les protides, et en éléments énergétiques, les glucides et les lipides. À cela s'ajoutent des éléments fonctionnels, c'est-à-dire des sels minéraux (Ca, P, K, Na, Mg...), des vitamines et de l'eau. Le lait est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses), dont les teneurs varient selon la race de l'animal, son état, son âge et son alimentation (**Wehrmüller et Ryffel, 2007**).

Le pH d'un lait normal varie de 6,2 à 6,8, son acidité titrable se situe entre 15 et 18°D. A 15°C, sa densité est en moyenne 1,032 ; le point de congélation du lait peut varier de -0,51 à -0,55, et à pression atmosphérique normale, son point d'ébullition est de 100,5°C (**Aboutayeb, 2011**).

**Tableau I** : Caractères physico-chimiques du lait cru de vache et de chèvre (**Lubin FAO, 1998**).

Propriétés	Lait de vache	Lait de chèvre
Couleur	Lait mat : lait normal. Blanc jaunâtre : lait riche en crème. Blanc bleuâtre : lait écrémé ou fortement mouillé.	blanc mat, contrairement au lait de vache, le lait de chèvre ne contient pas de $\beta$ -Carotène, aussi le beurre de chèvre a-t-il une couleur blanche.
Odeur	Odeur faible	une odeur assez neutre parfois en fin de lactation, il a une odeur dite Caprique
Saveur	Saveur légèrement sucrée, caractéristique et agréable.	Saveur douceâtre, neutre ; mais après stockage au froid il acquiert une saveur caractéristique.
pH	6,5- 6,7	6,3- 6,5
Densité du lait entier à 20°C	1,028-1,033	1,027-1,035
Point de congélation (°C)	-0,520- -0,550	-0,550- -0,583
Acidité titrable (°Dornic)	15-17	14-18
Consistance	Aspect homogène, propre, sans grumeaux.	
Se conserve au réfrigérateur à 4°C.		
La durée de conservation est de 72h et garde tout ses enzymes et leurs vitalités intactes.		

**I-3-1- Composition moyenne du lait de vache**

Les quantités des différents constituants principaux du lait peuvent varier considérablement d'une race à l'autre et d'un individu à l'autre d'une même race (tableau I, annexe II).

L'eau est l'élément quantitativement le plus important. Il représente environ les 9/10 du lait. Les autres éléments constituent la matière sèche totale qui s'élève habituellement à 125-130g par litre de lait. Certains composants sont présents en quantités sensibles donc plus ou moins dosables (la matière grasse, le lactose, les matières azotés, les matières salines). D'autres, au contraire, ne figurent qu'à l'état de traces et sont plus difficilement appréciables (les enzymes, les pigments et les vitamines) (**Alais et Liden, 1987**).

### **I-3-2- Composition moyenne du lait de chèvre**

La composition du lait de chèvre varie d'une façon considérable suivant le pays, le climat et la nourriture. Les chiffres indiqués dans le tableau I, annexe II sont par conséquent approximatifs. A première vue, le lait de chèvre semble similaire à celui de la vache, les protéines du lait de chèvre se rapprochent beaucoup de celles du lait humain, en particulier elles flocculent sous forme de particules plus petites et plus légères que celles du lait de vache. La dimension des globules de matière grasse est également plus petite ; ces éléments font que le lait de chèvre a une digestibilité excellente. En raison de l'absence de  $\beta$  caroténoïdes, le lait de chèvre est plus blanc que le lait de vache (**Mittaine, 1961 ; Moualek, 2011**).

### **I-4- Constituants physico-chimiques du lait écrémé en poudre**

Le lait écrémé en poudre doit être de qualité «consommation humaine» (Tableau II, annexe II). Cet aliment présente une faible teneur en eau et une absence d'odeur et de goûts désagréables ou anormaux. Il présente une proportion de glucides importante comparée aux autres éléments. Il possède un potentiel énergétique élevé et quelques vitamines (vitamine B12, B2, B5, B1, B9, un taux faible de vitamines C), des minéraux (Calcium, Phosphore, Iode, Zinc, Magnésium et un taux faible de Sélénium) le tableau II, annexe II indique les valeurs nutritives de cet aliment pour 100g (**Cassany, 2010**).

### **I-5- Microbiologie du lait**

Vu sa richesse nutritive d'une part et son pH de 6,6 d'une autre part ; le lait est considéré comme étant un aliment de choix et un substrat très favorable au développement des microorganismes. Par conséquent le lait comporte deux flores :

- **Une flore originelle** qui est composé essentiellement des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores (microcoques, streptocoques lactiques, lactobacilles);
- **Une flore de contamination** qui est composé d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels de goût, d'arôme, d'apparence ou de texture ou qui réduira la durée de conservation des produits laitiers, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les personnes qui consomment ces produits. La présence de microorganismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'environnement et l'homme (**Vignola, 2002**).

La flore d'altération est composée généralement de *Pseudomonas sp*, *proteus*, coliformes, les sporulées telles que *Bacillus sp*, et certaines levures et moisissures, et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella sp*, *S. aureus*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (Guiraud, 2003).

Parmi les grands types de flores microbiennes habituellement dénombrés dans les laits crus, les Staphylocoques et les corynéformes sont systématiquement mis en évidence, à des niveaux moyens similaires quelques soient les espèces animales laitières. Les bactéries lactiques sont également toujours représentées, mais sont plus nombreuses dans les laits de chèvres. Dans la plupart des cas pour les laits de vaches, les *Pseudomonas* sont également détectés, ainsi que des bactéries propioniques, des levures et des entérobactéries (Tableau II) (Laitier, 2011).

**Tableau II :** Ordre de grandeurs moyens (UFC/ml) de quelques groupes microbiens couramment dénombrés dans les laits crus de vaches et de chèvres (Laitier, 2011).

Groupe microbiens dénombrés	Lait de vache	Lait de chèvre
Staphylocoques et bactéries corynéformes	100-1000	1000
Lactocoques	10-100	100-1000
Lactobacilles	10-100	100
Leuconostocs	10-100	100-1000
Entérocoques	10-100	100-1000
Bactéries propioniques	10	
Bactéries à Gram négatif	100-1000	
✓ Entérobactéries	10	
✓ <i>Pseudomonas sp</i>	100-1000	10-100
Levures	10-100	10-100
Moisissures	<10	<10
Spoires aérobies	<10	
Bactéries coliformes	<10	100

### I-6- Contamination du lait par *Staphylococcus aureus*

La contamination initiale du lait est fortement influencée par les animaux excréteurs, et l'une des principales causes de contamination du lait cru par *S. aureus* reste la mammite sub-clinique ; la présence des staphylocoques dans le lait représente un risque pour la santé

humaine, parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *S. aureus* produisent des enterotoxines dont l'ingestion provoque une toxi-infection alimentaire à staphylocoques (Normanno et al, 2007). *S. aureus* cultivé à des températures comprises entre 6 °C et 46 °C, à un pH compris entre 4 et 9,8 (pH optimum : 6 à 7).

Cette espèce tolère une concentration élevée de NaCl (jusqu'à 20 %) et une  $A_w$  très réduite (0,83). La toxinogénèse intervient dans des conditions un peu plus restrictives que celles requises pour la croissance. Une fois formées, les enterotoxines sont remarquablement stables. Elles résistent à l'irradiation, aux enzymes protéolytiques et surtout à la chaleur. Alors que la bactérie est détruite lors de la pasteurisation du lait, les enterotoxines ne sont que partiellement inactivées. Elles ne sont complètement inactivées qu'après 20 à 40 min à 120 °C, elles peuvent être détectées quand le nombre de *S. aureus* atteint environ  $10^6$  à  $10^7$ /g ; Le lait pasteurisé est plus favorable à la croissance de *S. aureus* que le lait cru, car ce micro-organisme est un mauvais compétiteur en présence d'autres flores bactériennes. Dans le lait cru, le nombre initial de *S. aureus* doit être égal ou supérieur à celui de la flore concomitante pour pouvoir se multiplier suffisamment et produire des enterotoxines (Brisabois et al, 1997).

La prévention des toxi-infections alimentaires à staphylocoques se fait par la mise en place d'un programme d'action contre les mammites bovines, le maintien du lait à température de réfrigération et le strict respect des règles d'hygiène lors des manipulations à la ferme et à la laiterie, afin de limiter le nombre de *S. aureus* présents dans le lait. Elle requiert également un savoir-faire, un suivi des paramètres technologiques et un choix de ferments lactiques permettant d'inhiber au maximum la croissance de *S. aureus* au cours de la fabrication des fromages au lait cru (Brisabois et al, 1997).

## II- Les bactéries lactiques

### II- 1- Définition et caractéristiques principales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques représentent un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales, elles font partie de la flore intestinale et vaginale humaine et animale (Zarour et al, 2012).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. A quelques exceptions près, les bactéries lactiques sont généralement Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotoles, et ne possédant pas de catalase

(certaines souches possèdent une pseudo-catalase), de nitrate réductase, et de cytochrome oxydase. Elles ont des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, peptides, sels, acides gras et glucides) (**Ouadghiri, 2009**). Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54% (**Matamoros, 2008**). Les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (**Baharak, 1999**).

Leur métabolisme énergétique est principalement de types fermentaire. Elles peuvent être homofermentaires, l'acide lactique représentant alors 70% du produit métabolique ou bien hétérofermentaires, produisant 50% d'acide lactique mais également d'autres composés tels que : acide acétique, le CO<sub>2</sub> ou l'éthanol (**de Roissart et Luquet, 1994**).

Certaines espèces ou certaines souches peuvent en outre produire de l'acide formique ou de l'acide succinique (**Ouadghiri, 2009**).

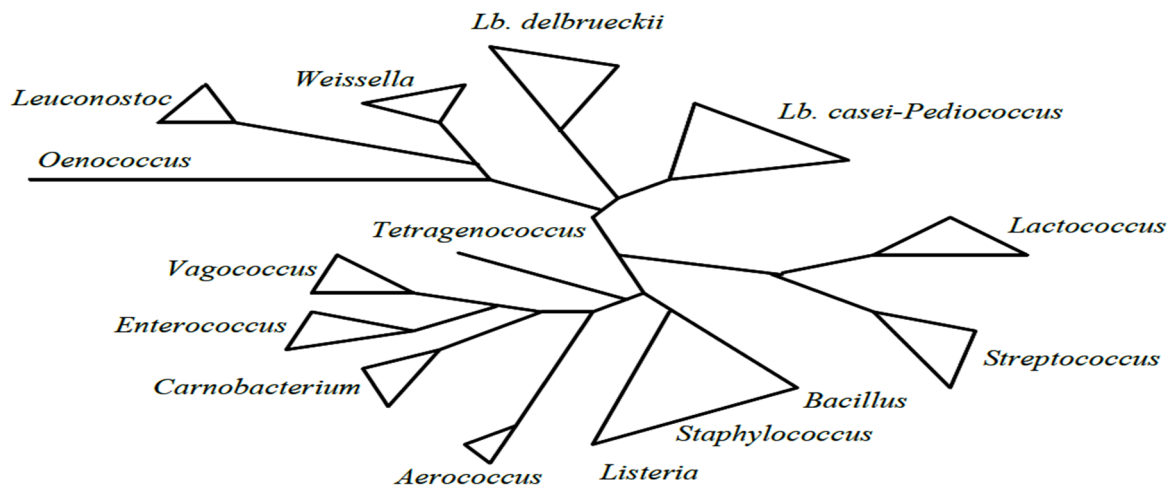
## II- 2- Taxonomie et classification des bactéries lactiques

Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* (**Garrity et Holt, 2001**). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* (G+ C < 50 mol%) (**Klein et al, 1998**).

La première classification des bactéries lactiques par Orla-Jensen (1919) est basée sur la morphologie, écologie et propriétés physiques (en particulier la température optimale de croissance), ainsi il les a classé en trois taxons : *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium* (**Matthias et Rudi, 2005**). En se basant sur le type fermentaire et sur la morphologie cellulaire (Tableau II ; annexe II), **de Roissart (1989)** elles ont été classés en quatre genres (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*) et 59 espèces.

Cependant, l'application de techniques de biologie moléculaire pour la détermination de relations phylogénétiques entre les bactéries lactiques associées aux aliments a induit en des changements significatifs dans leur classification taxonomique (Figure 1). Selon **Axelsson (2004)**, les bactéries lactiques englobent environ 20 genres et les plus importants sont : *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Le genre *Lactobacillus* est le plus grand, comportant autour de 80 espèces identifiées (**Axelsson, 2004**). Deux nouvelles espèces lactiques ont été isolées d'un milieu à base de viande. Il s'agit de *Lactobacillus versmoldensis* (**Krockel et al, 2003**) et *Vagococcus carniphilus*

(Shewmaker *et al*, 2004). Ces deux espèces ont été respectivement isolées du saucisson cru et de la viande hachée.



**Figure 1** : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques (d'après Axelsson, 2004)

Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences des ADN16S. La distance évolutive relative séparant deux genres est la somme des longueurs totales des branches.

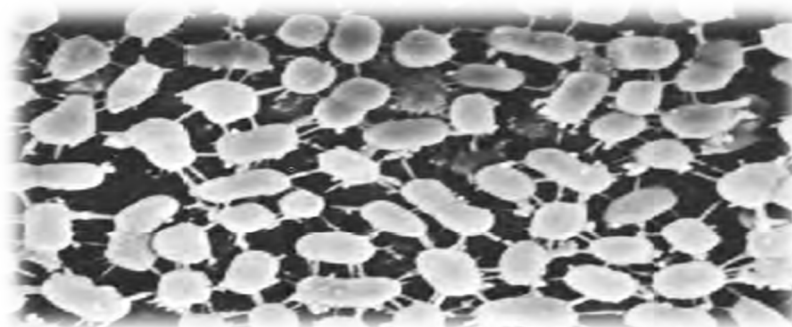
## II-3- Le genre *Leuconostoc*

### II-3-1- Définition et caractérisation

Le genre *Leuconostoc* a été défini en 1878 par Vantieghem. Le terme *Leuconostoc* vient du mot *Nostoc* qui est une algue bleue mucilagineuse (cyanobactérie) et de *leuco* qui veut dire blanc. (Devoyod et Poullain, 1988).

Les corps cellulaires des *Leuconostocs* peuvent être sphérique, mais souvent lenticulaires surtout lorsqu'ils sont cultivés sur milieu gélosé (Figure 2). Ce sont des coques en paires ou en chainettes comme les *Streptocoques* mais cette bactérie est hétérofermentaire produisant de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>. Ces espèces sont mésophiles (optimum : 20-30°C) et caractérisées par la production, à partir du citrate du lait, de diacétyle (et parfois d'acétate : *Ln mesenteroides* subsp. *cremoris*) et parfois par la synthèse de dextrans et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose. Ils sont chimioorganotrophes nécessitant, pour se développer, des milieux riches en facteurs de croissance complexes. (kihal, 2004 ; Bouix et Leveau, 1993).





**Figure 2 :** Fixation des *Leuconostocs* sur les moules en grés-vernissé (Examen en microscopie électronique à balayage (Grossissement 11500fois) (**Poullain et al, 1988**).

La classification des espèces de *Leuconostoc* est difficile, par le GC% de l'ADN mais surtout par l'hybridation ADN-ADN distingue trois espèces : *Ln mesenteroides* et ses trois sous espèces (*mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*), *Ln lactis*, *Ln paramesenteroides* et une espèce acidophile *Ln oens*. Les caractères distinctifs de ces espèces et sous-espèces sont résumés dans le (Tableau III, annexe II) (**Bouix et Leveau, 1993**).

### II-3-2- Habitat des *Leuconostocs*

On les isole du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes en particulier de la betterave (d'où leur ancien nom de *Betacoccus*), des végétaux en fermentation comme la choucroute, des produits de la panification et des solutions visqueuses de sucre dans la sucrerie (**Bouix et Leveau, 1993**). Les *Leuconostocs* sont très répandus dans la nature, ils sont fréquemment rencontrés dans les produits alimentaires d'origine animale y compris le lait cru, la viande, la volaille et le poisson (**Säde, 2011**). Ils peuvent exister aussi sur les fourrages verts ou secs, céréales (jusqu'à  $10^6$  germes/g d'herbe fraîche), poussières, matériel de traite et de fromagerie (**Jacky et al, 2004**). On les retrouve aussi dans la cavité buccale et dans le tube digestif de l'homme ou des animaux (**Adiv et Olival, 2004**). Cependant, les *Leuconostocs* ont été retrouvés dans les intestins du poisson et anchois frais mais pas comme espèce bactérienne dominante (**Säde, 2011**). Ces bactéries sont également connues dans les industries alimentaires, elles sont responsable de la production de la saucisse, du yogourt, du fromage, du babeurre, sauce soja et vinaigre. *Ln oenos* est absent du lait et isolé du vin, leur présence intervient dans le goût (**Bouix et Leveau, 1993**).

### II-3-3- Les *Leuconostocs* du lait

Les *Leuconostocs* sont fréquemment rencontrés dans le lait. **El-Gendy et al. (1983)** ont isolé principalement *Leuconostoc parmesenteroides* de lait cru salé. Dans le lait utilisé pour la fabrication du fromage blanc saumuré, **Chomakov et Krov (1975)** a isolé des *Leuconostocs* appartenant principalement à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. **Nunez et al. (1984)** ont montré que dans les laits de brebis crus réfrigérés, *Leuconostoc dextranicum* était l'espèce de bactéries psychrotrophes Gram-positive la plus fréquemment isolée. **Maret et Sozzi (1976)** ont isolé *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* de lait d'alpage utilisé pour la fabrication de fromage à raclette. **Faticenti et al. (1979)** ont montré que dans les laits de chèvre de Sardaigne les *Leuconostocs* étaient présents en nombre limité et qu'ils appartenaient essentiellement à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*.

### II-4- Rôles technologiques des *Leuconostocs*

Les bactéries lactiques sont principalement utilisées en tant que levains dans les produits alimentaires fermentés où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques et d'augmenter la durée de conservation (Tableau IV, annexe II) Parmi les bactéries les plus utilisées en industrie laitière, les bactéries du genre *Leuconostoc*, elles sont utilisées réellement et potentiellement comme levains d'arôme, pour améliorer la structure des fromages et pour éliminer certains défauts de goût (**Dortu et Thonart, 2009**).

#### II-4-1- Utilisation des *Leuconostocs* pour améliorer la structure des fromages

Les *Leuconostocs* sont considérés comme des ingrédients technologiques essentiels dans la formation des pores dans le fromage bleu à pâte persillée comme le Roquefort, due à la production de dioxyde de carbone qui se forme à partir de deux substrats distincts : le lactose et l'acide citrique. La stabilité de ces ouvertures dépend de la cinétique de la production de CO<sub>2</sub> par les *Leuconostocs*. Ces ouvertures facilitent le développement, la croissance et l'installation correcte de *Penicillium roqueforti*. L'utilisation des levains BD (contiennent à la fois des *Leuconostocs* et *S. lactis subsp. diacetylactis* comme producteurs d'arôme) dans le fromage montrent une fermentation de l'acide citrique plus active et par conséquent produisent plus de CO<sub>2</sub> donc plus d'eux que les levains B (ouverture normale des fromages d'Edam et de Gouda). Dans ce cas on utilise des souches de *Leuconostoc cremoris* qui sont des souches de faibles production de gaz dans le lait (**Devoyod et Poullain, 1988 ; Zarour et al, 2012**).

## II-4-2- Utilisation des *Leuconostocs* comme levains d'arôme

La production de diacétyl et d'acétoïne est sans doute le caractère le plus utilisé des *Leuconostocs*. Le niveau de diacétyl qui est capable de donner de l'arôme souhaité est faible (1,5 à 5 ppm), par conséquent, l'ajout d'un nombre suffisant de cellules dans les conditions physico-chimiques convenable est nécessaire pour l'utilisation du citrate par les *Leuconostocs* (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2003).

Les cultures pures de *Leuconostocs* utilisent le citrate très rapidement (Figure 3), par contre elles ne produisent du diacétyl et de l'acétoïne que tardivement, lorsque le milieu est devenu suffisamment acide. Walsh et Cogan (1973) ont mesuré les quantités de citrate utilisé et les productions dans le lait à 21°C d'acétoïne, de diacétyl, d'acétaldéhyde et d'acide lactique par différents levains mixtes (type D, B et BD). Ils ont montré que les cultures contenant *Str. diacetylactis* (BD et D) utilisaient le citrate plus rapidement et produisaient plus de di acétyl, d'acétoïne et d'acétaldéhyde que les levains de type B (*Leuconostocs* seuls). L'addition de manganèse ( $Mn^{2+}$ ) au lait dans les cultures de levains mixtes, stimule la croissance des *Leuconostocs*, mais non celles des streptocoques et influe donc sur la vitesse de fermentation des citrates dans les levains contenant *Ln. cremoris* (Devoyod et Poullain, 1988).

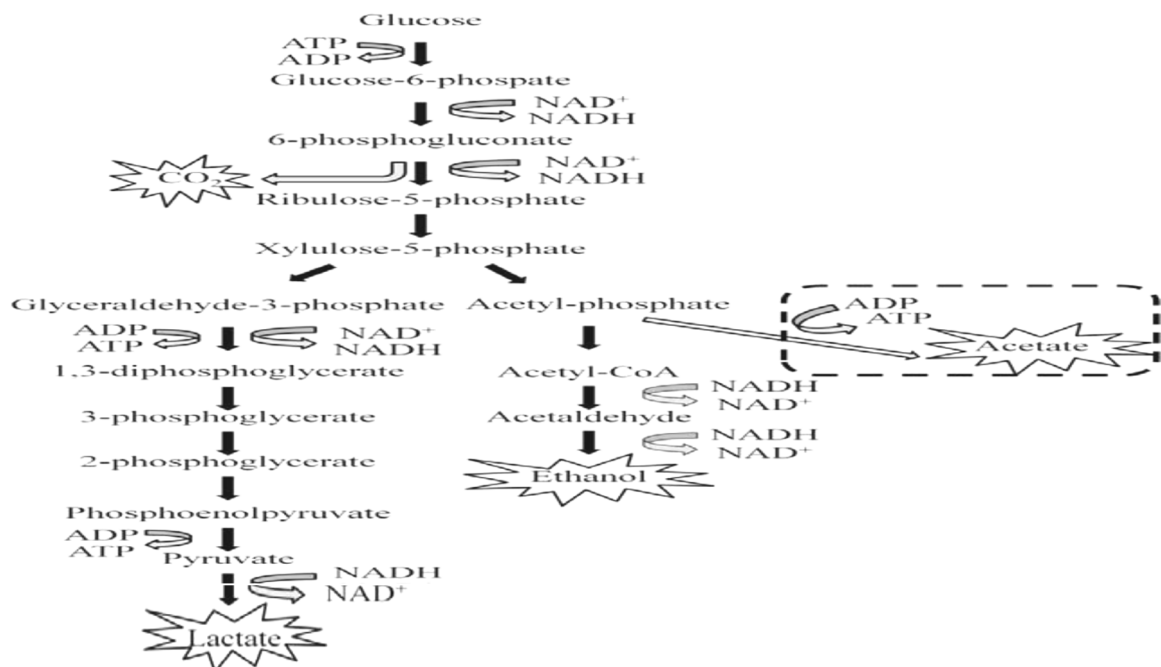


Figure 3: Schéma simplifié du métabolisme sucre-citrate de *Ln mesenteroides* (Säde, 2011).

### II-4-3- Utilisation des *Leuconostocs* pour améliorer certains défauts de goût

Une petite quantité d'acétaldéhyde est reconnue comme participant à l'obtention d'un bon arôme; par contre une surproduction de ce composé par rapport au diacétyle provoque un défaut dit de «vert» ou d'« âcre». Ce défaut peut être enrayé par l'emploi de souches de levains qui métabolisent l'acétaldéhyde, il est possible d'éliminer le défaut de «vert» d'une culture de bactéries lactiques en utilisant les *Leuconostocs* ; mais pour cela il est nécessaire d'en ajouter une grande quantité. Les quelques cellules de *Leuconostocs* sont vraisemblablement rapidement surpassées par les streptocoques qui métabolisent activement, et elles doivent s'adapter pour se développer et croître dans de nouvelles conditions, la proportion de *Str. diacetylactis* et de *Ln. citrovorum* augmentent lorsque la température d'incubation des cultures mixtes s'élevait de 18 à 24 °C. De plus, les lactocoques sont capables de métaboliser des substances antibiotiques qui inhibent ou restreignent la croissance et la multiplication de *Ln. cremoris* (Devoyod et Poullain, 1988).

### II-5- Intérêt des *Leuconostocs* dans les aliments fonctionnels

Ces « aliments santé » sont définis comme des aliments destinés à être consommés au sein d'une alimentation équilibrée et contenant des composés bioactifs, pouvant améliorer la santé ou réduire le risque des maladies, il s'agit d'aliment comportant des minéraux, des vitamines, des acides gras spécifiques, des fibres alimentaire, des antioxydants, et de plus en plus, des pré et probiotiques (Fabre, 2004).

#### II-5-1- *Leuconostoc* comme probiotique potentiel

Pour exercer une influence positive sur l'organisme, les espèces du genre *Leuconostoc* doivent survivre en quantité suffisante au passage à travers le tractus digestif supérieur pour arriver vivantes dans l'intestin, permettant ainsi l'interaction avec le microbiote (flore intestinale) et notamment l'inhibition de la croissance de nombreux pathogènes et bactéries putréfiantes ; la régulation du transit intestinal ; l'amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose et la réduction de la durée des diarrhées (l'intégration de  $10^8$  g<sup>-1</sup> de *Lc. lactis* et de *Ln. mesenteroides* dans le lait fermenté réduit la durée des diarrhées chez les jeunes enfants) (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2003).

### II-5-2- Production de glucane-saccharase

La présence des *Leuconostocs* dans le sol est responsable d'une augmentation de la viscosité dans le sirop de betteraves ou de cannes, l'enzyme responsable de ce phénomène est appelé dextrane-saccharase. Seules les souches *Ln mesenteroides sp mesenteroides* et *Ln mesenteroides sp dextransicum* synthétisent du glucane, ces microorganismes assurent le départ de fermentation de produits végétaux traditionnellement fermentés, entrant dans l'élaboration du vin, du levain, de la choucroute, de produits laitiers, d'ensilage pour les animaux (Fabre, 2004).

### II-5-3- Production de polysaccharides et de mannitol

Les souches *Ln mesenteroides* produisent des exopolysaccharides (EPS) qui permettraient de réguler la viscosité d'un fluide dans les denrées alimentaires, les produits pharmaceutiques et cosmétiques. En ce qui concerne les produits laitiers, ils augmentent le temps de séjour de lait fermenté ingéré dans le tractus gastro-intestinal et donc ils favorisent la colonisation transitoire des bactéries probiotiques (Schmidt, 1999 ; Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2003).

Le mannitol formé principalement par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* est un marqueur hautement sensible de la détérioration de la canne et de la betterave sucrières utilisé pour prédire les problèmes multiples que cela peut engendrer en fabrication. *Ln. pseudomesenteroides* et *Ln. mesenteroides* sont connus pour leur capacité à produire du mannitol dans la fermentation du fructose, il est également applicable à des produits alimentaires pour diabétiques (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2003).

### II-6- Effet antibactérien des espèces du genre *Leuconostoc*

Les bactéries lactiques dont le genre *Leuconostoc* produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes telles que les acides organiques, le dioxyde de carbone et le diacétyle. Elles jouent un important rôle hygiénique en abaissant le pH et en sécrétant une variété de composés inhibiteurs qui empêchent le développement de bactéries indésirables (Zarour et al, 2011).

## II-6-1- Production de métabolites inhibiteurs

Durant la fermentation des produits laitiers, les bactéries lactiques métabolisent le lactose en acide lactique diminuant ainsi le pH, qui crée un environnement défavorable pour la croissance des micro-organismes pathogènes et d'altération des aliments. Le bas pH dû à la fermentation des aliments renforce l'effet antibactérien des acides organiques produits.

En plus de la réduction du pH par la production d'acide lactique, les *Leuconostoc* produisent d'autres composés antibactériens qui peuvent être classés comme composés de faible poids moléculaires tels que :

- Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) ;
- Diacétyl (2,3- butanedione) ;
- Ethanol ; Et les composés de haut poids moléculaire tels que les bactériocines (**Aslim et al, 2006**). Ce qui peut contrarier la croissance de quelques bactéries pathogènes dans les aliments (**Ammor et al, 2006**).

L'effet antimicrobien dû aux bactériocines produites par *Leuconostoc sp* a été observé pour la première fois dans les années 90. Plus tard, différentes bactériocines produites par *Leuconostoc sp* ont été isolées. Parmi ces bactériocines, la leucocine A-UAL 187, produite par *Leuconostoc gelidum* A-UAL 187, la leucocine B-Ta11a produite par *Leuconostoc carnosum* Ta11a, la mésentéricine Y105 produite par *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* Y105.....etc.

En se basant sur les homologues de séquences, les bactériocines produites par *Leuconostoc* appartiennent à deux classes (classe IIa ou classe IIb). Il a été montré que les bactéries du genre *Leuconostoc* renfermaient un ou plusieurs plasmides de différentes tailles. Ces plasmides portent différents systèmes génétiques parmi lesquels celui impliqué dans la biosynthèse des bactériocines, le transfert horizontal chez *Leuconostoc sp* s'avère être un phénomène courant. Ainsi, des séquences d'insertion (« Inversed Sequences », I.S.) ont été identifiées et analysées par Johansen et Kibenich, chez des bactéries appartenant au genre *Leuconostoc*, suggérant ainsi la possibilité d'un échange génétique entre les différentes espèces bactériennes (**Makhloufi, 2011**).

### I-1- Lieu de la réalisation du travail

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Appliquée (Laboratoire de Microbiologie du lait et des probiotiques) de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, sous la direction du D<sup>r</sup> FARADJI.

L'objectif de notre travail a porté sur l'étude de la cinétique de croissance et le pouvoir acidifiant de la souche test et la souche cible (*Staphylococcus aureus*) dans les différents types de lait (lait de vache, lait de chèvre et lait écrémé) puis sur l'étude de l'activité antibactérienne de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* vis-à-vis de *S aureus*.

### I-2- Origines des souches

Les souches lactiques *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* (37 et Al<sub>3</sub>), *Ln mesenteroides ssp cremoris* (25) et la souche pathogène *S aureus* utilisées dans cette étude proviennent de la collection de souches du laboratoire de Microbiologie Appliquée (laboratoire de microbiologie de lait et des probiotiques).

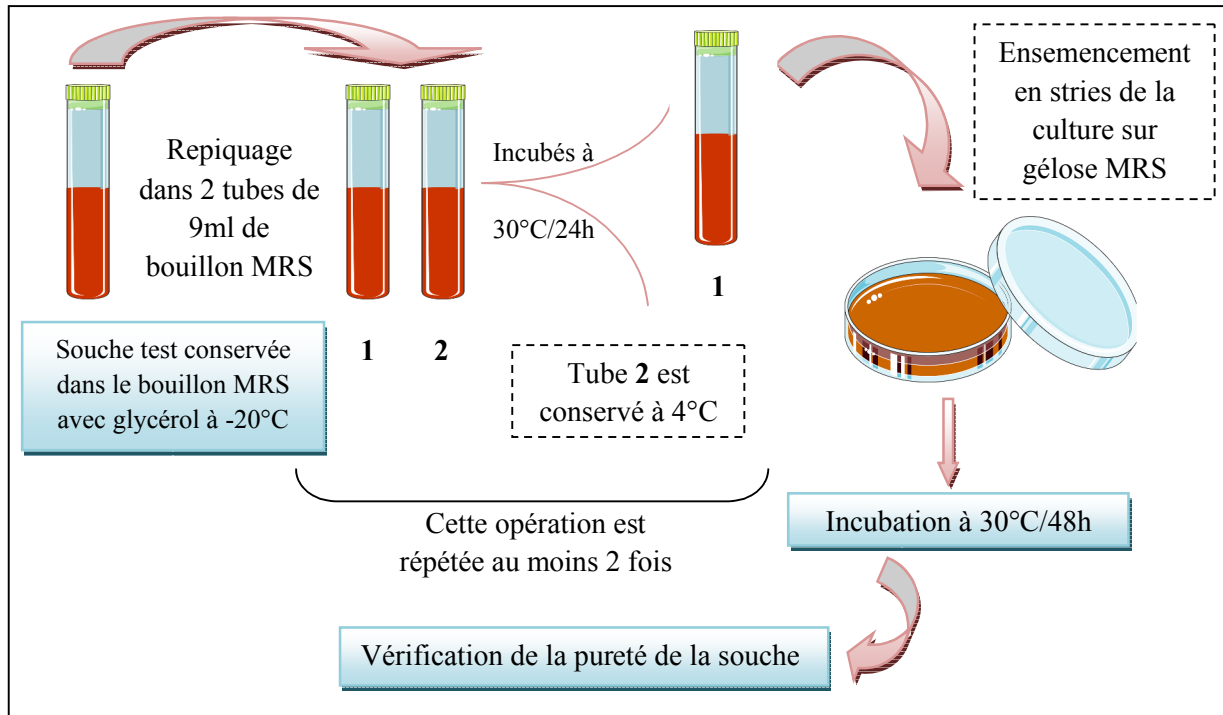
- Les souches de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* et *Ln mesenteroides ssp cremoris* ont été isolées à partir de lait cru de chèvre et identifiées par D<sup>r</sup> FARADJI puis conservées sur bouillon MRS additionné de glycérol à - 20°C ;
- La souche *S aureus* a été conservée dans les mêmes conditions sur bouillon nutritive.

### I-3- Revivification et vérification de la pureté des souches de *Leuconostoc* testées

A partir de la culture sur bouillon MRS, plusieurs repiquages successifs ont été réalisés dans des tubes contenant 9ml de bouillon MRS puis incubées à 30°C pendant 24 heures ;

Au terme de la période d'incubation du dernier repiquage, un tube est soumis pour la réalisation d'un ensemencement en stries sur gélose MRS à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubé à 30°C pendant 48 heures et l'autre tube est conservé à + 4°C ;

La revivification des souches tests de *Leuconostoc* (25, 37 et Al<sub>3</sub>) est représentée dans la figure suivante ;



**Figure 4 :** Revivification et vérification de la pureté des souches tests

Après 48heures d'incubation, la pureté des souches est vérifiée en réalisant quelques tests morphologiques et physiologiques rapides :

- Observation directe de l'aspect des colonies sur gélose MRS ;
- Observation microscopique à l'état frais (mobilité) ;
- Réalisation du test catalase ;
- Réalisation de la coloration de Gram ;
- Observation de la morphologie des cellules.

#### **I-4- Revivification et vérification de la pureté de la souche cible**

A partir de la culture sur bouillon nutritif, plusieurs repiquages successifs ont été réalisés dans des tubes contenant 5ml de bouillon nutritif puis incubés à 37°C pendant 24 heures ;

Au terme de la période d'incubation du dernier repiquage, un tube est soumis pour la réalisation d'un ensemencement en strie sur gélose nutritive à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubées (les boîtes de pétri) à 37°C pendant 48 heures et l'autre tube est conservé à + 4°C ;



La pureté de la souche est vérifiée par :

- La réalisation d'un ensemencement en strie sur milieu Chapman, puis incubée à 37°C pendant 24 heures ;
- Observation macroscopique de l'aspect des colonies sur gélose Chapman ;
- Réalisation du test catalase ;
- Observation de la morphologie des cellules à l'aide d'un microscope ;
- Réalisation de la coloration de Gram.

### **I-5- Echantillons de lait**

Les échantillons de lait choisis pour effectuer cette étude sont des laits crus de vache, de chèvres et de lait écrémé. Les origines de ces trois types de lait sont comme suit:

- Les échantillons de lait de vache ont été prélevés d'un troupeau de vache élevé dans la région de Tala hamza, Bejaia ;
- Les échantillons de lait de chèvre proviennent de deux régions différentes, la première du centre de recherche en agriculture de montagne d'Oued Ghir « INRA : Institut National de Recherche Agronomique » et la seconde, de la région d'Ighil Ouazoug, Bejaia ;
- Enfin le lait écrémé qui a été reconstitué à 10% (par la poudre de lait écrémé) fourni par la laiterie Candia.

#### **I-5-1- Prélèvement et transport des échantillons de lait**

Avant de passer au prélèvement, les mains des manipulateurs ainsi que la mamelle et la peau des trayons ont été bien nettoyés. Le prélèvement se fait directement au pis des mamelles dans un flacon de 200 ml préalablement stérilisé après avoir écarté les premiers jets. Les prélèvements ont été réalisés le matin, l'acheminement des échantillons se fait directement dans une glacière. Trois échantillons de 200 ml de chaque type du lait (lait de vache, lait de chèvre et lait écrémé) ont été transportés à la laiterie Tchîn-lait Candia pour une analyse physico-chimique, les trois autres échantillons sont soumis au laboratoire pour analyses microbiologiques. Le temps maximal entre le prélèvement et les analyses des échantillons est de deux heures.

## I-6- Analyses physico-chimiques des échantillons du lait

### I-6-1- Mesure du pH

La mesure du pH nous renseigne sur l'acidité du lait, le pH d'un lait normal frais est neutre : 6,5 à 6,7. Cependant, s'il y'a une prolifération des coliformes une partie du lactose sera fermentée en acide lactique entraînant ainsi une baisse du pH (**Aboutayeb, 2011**).

Le pH est déterminé en utilisant un pH-mètre portable (HANNA – HI 99161) (figure5) qui doit être d'abord étalonné à l'aide de deux solutions tamponnées à pH 7 et 4 (dans cet ordre), l'étalonnage est répété avant chaque utilisation.



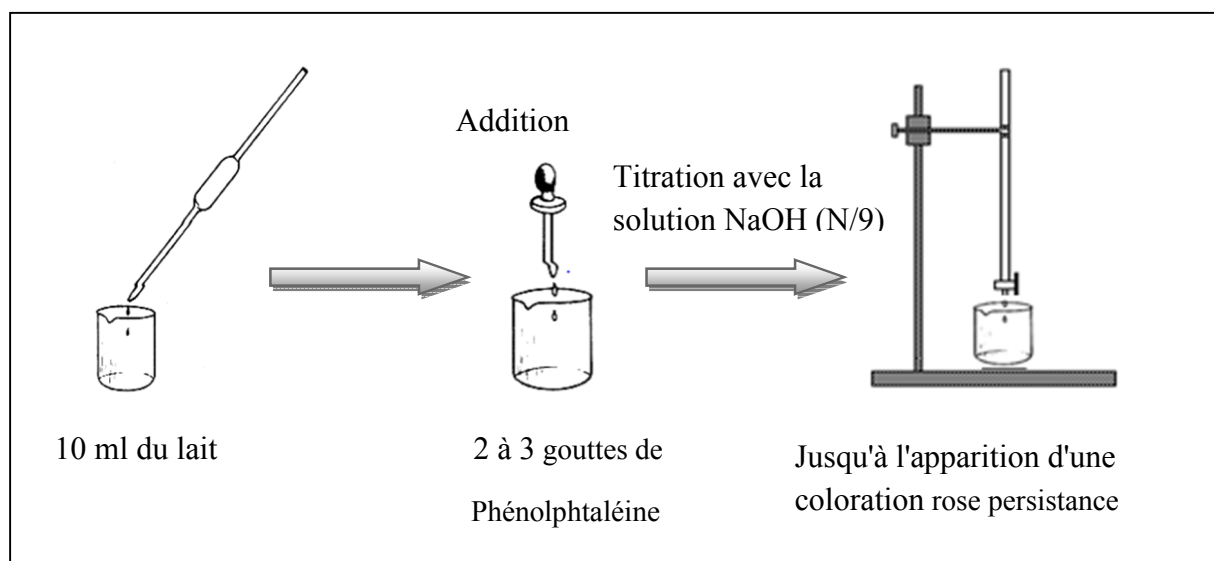
Figure 5 : pH mètre-portable HANNA- HI 99161

### I-6-2- Mesure de l'acidité Dornic

Ce contrôle peut être utile pour détecter les laits formolés qui, dans ce cas, ont une acidité supérieure à la normale suite à la transformation du formol, qui est un aldéhyde, en acide lactique (**Aboutayeb, 2011**).

#### ❖ Mode opératoire

- Introduire dans un Becher 10 ml d'échantillon à analyser, auxquels on ajoute 2 à 3 gouttes de l'indicateur coloré (phénolphtaléine) ;
- Titrer avec la solution NaOH (N/9) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante (figure 6).



**Figure 6 :** Méthodologie de mesure de l'acidité Dornic du lait

L'acidité du lait est exprimée comme suit :  $AT = V \times 10$  (D°)

**AT:** Acidité titrable

**V:** volume en ml correspondant à la chute de burette.

### I-6-3- Mesure de divers paramètres physico-chimiques à l'aide de MilkoScan Minor

L'analyse de divers paramètres physico-chimiques ont été réalisées au laboratoire physico-chimique de l'unité Tchén-lait Candia par le chef du service de laboratoire M<sub>r</sub> Medjber Halim.

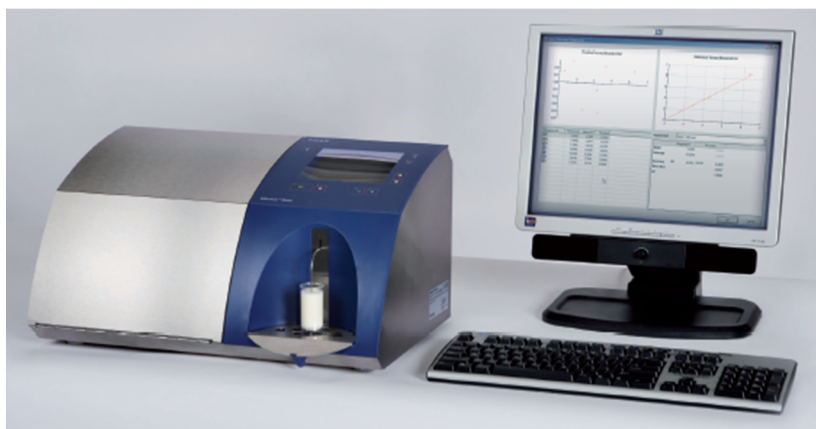
La détermination de la composition du lait a été effectuée à l'aide d'un appareil appelé MilkoScan Minor qui permet de mesurer avec précision tout un éventail de paramètres dont :

- **La teneur en lactose :** le lactose est le sucre spécifique du lait, il est responsable par son goût sucré et par sa concentration élevée de la saveur douce et agréable du lait frais ;
- **Taux de protéines :** les matières protéiques du lait sont représentées principalement par la caséine qui est la protéine caractéristique du lait.
- **Taux de matière sèche :** le taux de l'extrait sec exprime la teneur en éléments secs du lait.

- **Point de congélation** : il est mesuré en degrés Celsius (°C). Cette analyse sert à vérifier qu'il n'y a pas eu un ajout d'eau.
- **La teneur en matières grasses** : La matière grasse existe dans le lait sous forme de globules gras.
- **Taux de l'extrait sec dégraissé** : Le taux de l'extrait sec dégraissé exprime la teneur en éléments secs débarrassés de la matière grasse.

#### I-6-4- Mode d'emploi du MilkoScan Minor

Le MilkoScan Minor (Figure 7) permet de déterminer la composition du produit. Il mesure avec précision tout un éventail de paramètres dont la teneur en matières grasses, les protéines, en lactose, taux de matière sèche, extrait sec dégraissé et le point de congélation. Seule une préparation minimale des échantillons est nécessaire à froid et en l'introduisant puis appuyant sur la touche « démarrer » et les résultats sont obtenus en 2 minutes uniquement et enregistrés automatiquement sur l'écran de contrôle.



**Figure 7** : MilkoScan Minor

#### I-6-5- Détermination du taux de matière grasse par la méthode de Gerber

La détermination du taux de matière grasse pour les trois échantillons a été également réalisée par la méthode de Gerber qui est valable seulement pour les laits frais. Les constituants du lait autres que la matière grasse sont dissous par l'acide sulfurique. Et grâce à la force centrifuge (Figure 8) et l'ajout d'une petite quantité d'alcool amylique ( $C_5H_{11}OH$ ) qui dissout la matière grasse, cette dernière se sépare et monte au sommet du butyromètre. La teneur en matière grasse est déterminée sur l'échelle du butyromètre (Aboutayeb, 2011).

Ce contrôle peut être utile dans plusieurs cas : détecter la fraude de l'écémage du lait frais, vérifier la standardisation du taux de matière grasse du lait avant la pasteurisation ou la stérilisation, etc.

#### ❖ Mode opératoire

- Mettre 10 ml d'acide sulfurique dans un butyromètre ;
- Ajouter 11 ml de lait cru ;
- Ajouter 1 ml d'alcool iso-amylque ;
- Fermer le butyromètre avec un bouchon et mélanger ;
- Centrifuger pendant 5 minutes.



**Figure 8 :** Centrifugeuse FUNKE-GERBER pour le lait

#### I-7- Analyse microbiologique des échantillons de lait cru

L'analyse microbiologique du lait est une étape importante qui vise, d'une part à conserver les caractéristiques organoleptiques et sensorielles du lait, donc d'allonger sa durée de vie et d'autre part, à assurer la garantie hygiénique et la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes et des toxines microbiennes (**Vignola, 2002**).

Les analyses effectuées ont été portées sur la recherche et le dénombrement d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents dans le lait :

- ❖ Flore totale aérobie mésophile (FTAM) ;
- ❖ Les Coliformes totaux et fécaux ;
- ❖ Les Streptocoques totaux et fécaux ;
- ❖ Les Entérobactéries ;
- ❖ Les levures et les moisissures ;
- ❖ Les micro-organismes pathogènes : *Staphylococcus aureus* et Salmonelles
- ❖ Les bactéries lactiques.

Avant de passer à l'analyse, on agite vigoureusement l'échantillon afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, on retourne rapidement et plusieurs fois le flacon de lait. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser si elle se forme (**Larpen, 1997**).

### I-7-1- Préparation des dilutions

Une série de dilutions est réalisée à partir de l'échantillon qui a été préalablement homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes ;

- A l'aide d'une micropipette stérile, 1ml de l'échantillon à analyser est prélevé, ensuite introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique (dilution  $10^{-1}$ ) ;
- Agiter à l'aide d'un vortex afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des microorganismes et répéter ces étapes jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ .

### I-7-2- Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

Le dénombrement de la FTAM est un indicateur de la qualité sanitaire globale d'un lait, il est réalisé sur gélose PCA. Une série de deux boites estensemencée en masse à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ), les boites sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant  $72^{\circ}\text{C}$  (**Vignla, 2002**).

Les boites retenues pour le dénombrement doivent contenir au minimum 15 colonies et ne pas dépasser un maximum de 300 colonies. Le nombre des germes est calculé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(N_1 + 0.1N_2) D}$$

$\sum C$  : sommes de colonies comptées par boites ;

D : la première dilution positive ;

$N_1$  : nombre de boites comptées dans la première dilution ;

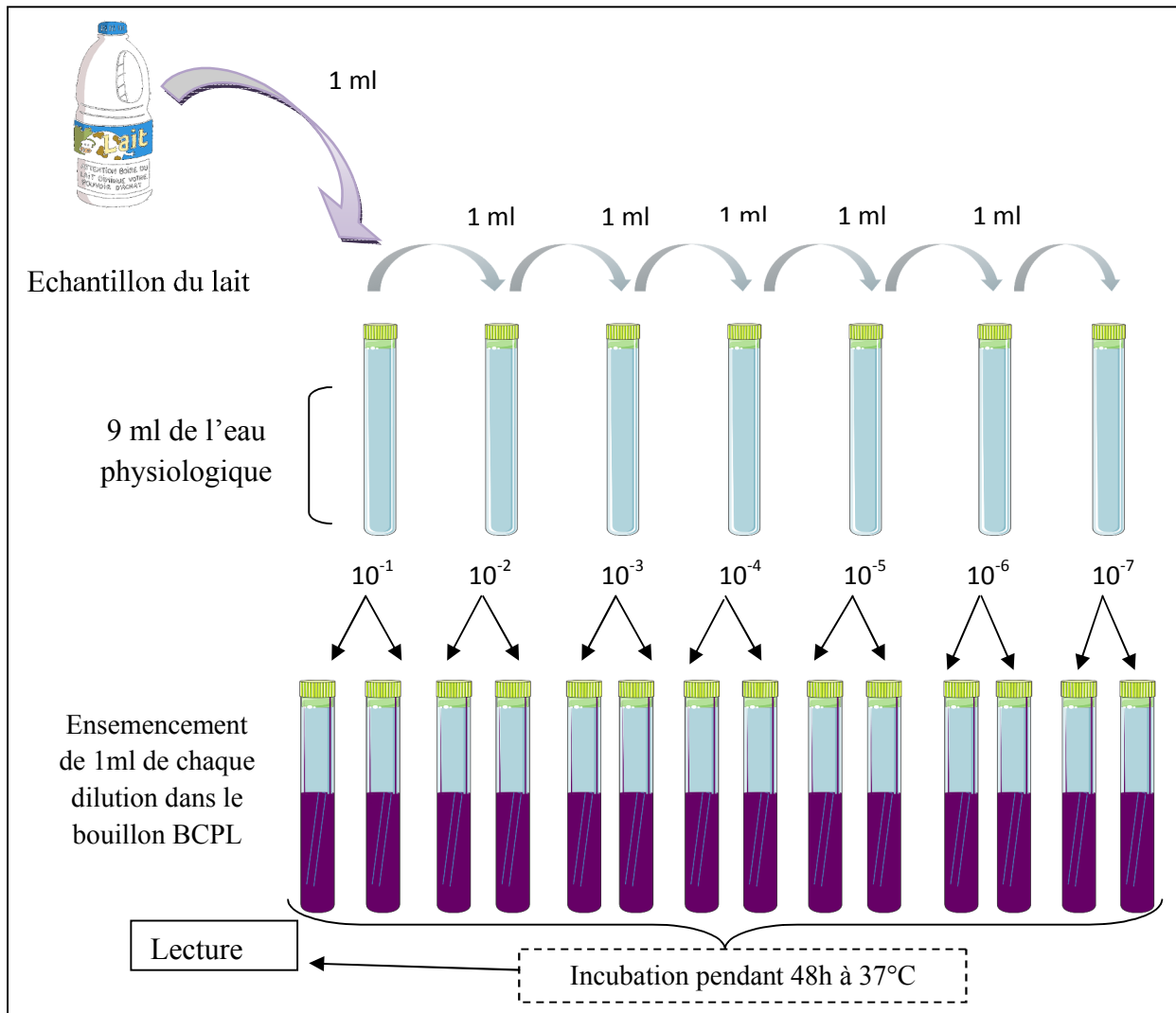
$N_2$  : nombre de boites comptées dans la deuxième dilution ;

$N_2$  : nombre de boites comptées dans la deuxième dilution.

La même formule est utilisée pour la détermination du nombre de coliformes, Entérobactéries, levures et moisissures, Salmonelles ainsi que les staphylocoques.

### I-7-3- Dénombrement des coliformes totaux

La numération des coliformes a été réalisée par la méthode de culture sur milieu liquide (NPP). En ensemençant 1 ml de lait (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans une série de deux tubes de bouillon BCPL. Les essais sont effectués en double et les résultats sont exprimés selon la table de Mac Grady. Chaque tube est préalablement muni d'une cloche de DURHAM destinée à piéger la formation éventuelle de gaz (Figure 9).



**Figure 9 :** Dénombrement des coliformes totaux

Un test de confirmation est requis pour les tubes positifs ayant eu une croissance (virage de couleur vers le jaune) et une production notable de gaz (1/10) (Vignola, 2002).

Pour le lait de chèvre, les coliformes fécaux sont recherchés sur gélose lactosée et citratée au désoxycolate, un ensemencement en masse à raison de deux boîtes par dilution préparée à partir des dilutions ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) puis incubées à  $44^{\circ}\text{C}$  pendant 24h.

Pour le lait de vache, les coliformes fécaux sont recherchés sur gélose EMB, un ensemencement en masse à raison de deux boîtes par dilution préparées à partir des dilutions ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) puis incubées à 44°C pendant 24h.

#### **I-7-4- Dénombrement des Streptocoques totaux et fécaux**

La numération des Streptocoques est réalisée avec la méthode de culture sur milieu liquide (méthode de NPP), une série de deux tubes de milieu de Rothe est ensemencée à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) (Novello, 2003).

Après 24h (ou 48 h) d'incubation à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un trouble. La confirmation de la présence de Streptocoques fécaux est réalisée par un ensemencement de deux tubes d'Eva-Lizky par un tube positif de Rothe puis incubés à 37°C pendant 24h.

#### **I-7-5- Dénombrement des Entérobactéries**

Le dénombrement des entérobactéries est effectué sur gélose sélective VRBG, un ensemencement en masse en raison de deux boîtes par dilution préparées à partir des dilutions ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ), puis incubées à 37°C pendant 24h ;

La présence d'*Escherichia coli* est confirmée par un isolement sur milieu EMB puis une incubation de 48h à 44°C (Novello, 2003).

#### **I-7-6- Dénombrement des levures et moisissures**

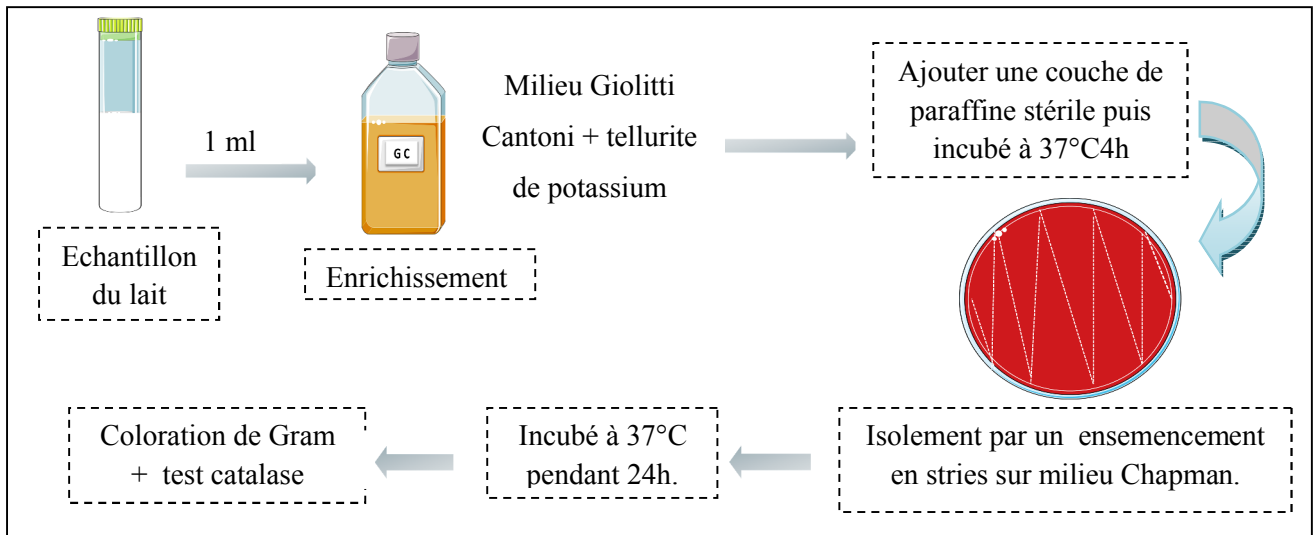
Le dénombrement des levures et moisissures nous permet d'apprécier la stabilité de conservation du lait, il est réalisé par un ensemencement en masse de 1 ml dans la gélose Sabouraud à raison de deux boîtes par dilutions ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ). L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h.

#### **I-7-7- Recherche de *Staphylococcus aureus***

La recherche de *Staphylococcus aureus* est basée sur l'emploi des milieux sélectifs :

Un milieu d'enrichissement qui est le Giolitti Cantoni et un milieu d'isolement qui est la gélose de Chapman (Figure 10).





**Figure 10 :** Recherche de *Staphylococcus aureus*

### I-7-8- Dénombrement des Salmonelles

Le dénombrement des Salmonelles a été réalisé sur le milieu SS (Salmonella-Shigella), une série de deux boîtes est ensemencée en masse à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ), puis une série de boîtes est incubée à  $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$  et l'autre est incubée à  $44^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ .

### I-7-9- Dénombrement des bactéries lactiques

La flore lactique est dénombrée sur la gélose MRS (Man Rogosa Sharp), une série de deux boîtes est ensemencée en masse à chaque fois par une des dilutions préparées ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ). L'incubation est effectuée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 48h.

### I-8- Stérilisation du lait

Les échantillons de différents lait sont répartis dans des flacons propres à raison de 250 ml, la stérilisation du lait consiste à les porter à une température de  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes au bain marie. On détruit ainsi tout germe microbien, y compris les spores. Après refroidissement, les échantillons de différents lait sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  ;

Pour vérifier la stabilité du lait stérilisé, un flacon de chaque type de lait est incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48h.

### **I-9- Mise en évidence de l'activité antibactérienne *in vitro* des souches de *Leuconostocs***

L'activité antibactérienne des souches de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* (37 et Al<sub>3</sub>) et *Ln. mesenteroides ssp cremoris* (25) à l'égard de *S. aureus* a été mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots.

#### **I-9-1- Test des spots**

Après avoir rempli les boîtes de pétri avec de la gélose MRS (solidifiée et séchée), on dépose séparément 5µl de la culture fraîche (incubée à 30°C pendant 18h) de chaque souche de *Leuconostoc* (25, 37 et Al<sub>3</sub>) en spots. Les boîtes sont séchées près du bec bunsen pendant 30 min puis incubées à 30°C pendant 18heures.

Après la période d'incubation, la gélose est recouverte de 1ml de la culture fraîche de la souche pathogène (*Staphylococcus aureus*) à un taux de 10<sup>8</sup> UFC/ml, additionnée avec 9ml de gélose nutritive fondue en surfusion, puis incubées à 37°C pendant 18h. Au terme de la période d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

La souche de *Leuconostocs mesenteroides* ayant témoigné de la meilleure antibiose vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, sera sélectionnée et retenue pour le reste de l'étude.

### **I-10- Standardisation de L'inoculum de la souche lactique sélectionnée dans les différents types de lait**

Afin de pouvoir étudier l'influence des différents types du lait sur l'activité antibactérienne de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* vis-à-vis de *S. aureus* une standardisation de l'inoculum est indispensable.

L'inoculum de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* (37) est revivifié par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 30°C pendant 48h, on ensemence dix colonies bien isolées et bien distinctes de la souche lactique dans deux tubes stériles contenant 9 ml de lait, et cela a été effectué pour chaque type de lait (lait de vache, de chèvre et lait écrémé) qui ont été préalablement stérilisés, puis incubés à 30°C pendant 18h (culture fraîche).

Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales sont effectuées dans de l'eau physiologique stérile (10<sup>-1</sup> jusqu'à 10<sup>-9</sup>), 1ml des dilutions (10<sup>-7</sup> jusqu'à 10<sup>-9</sup>) est ensemencé

en masse sur gélose MRS 48h à 30°C. Un dénombrement est effectué après incubation à l'aide d'un compteur de colonies (suntex colony, conter 570).

### **I-11- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche lactique sélectionnée dans les différents types du lait**

L'activité acidifiante des bactéries lactiques représente leur principale activité métabolique et qui dépend directement de leur croissance. La façon la plus indiquée pour la mesure d'acidité consiste à suivre d'une part, l'évolution du pH des cultures au cours du temps et d'autres part, à doser simultanément l'acidité Dornic par la soude NaOH N/9 (Gourgaude et al, 1997).

Afin d'étudier la cinétique de croissance de *Leuconostoc mesenteroides*, la souche *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* a été choisie et inoculée dans le milieu lait. Cette étude a été réalisée dans les différents types du lait (lait de vache, de chèvre et lait écrémé). La culture fraîche de la souche 37 (10 colonies dans 9ml du lait) obtenue après 18h d'incubation à 30°C, est répartie en tubes contenant 9ml de lait stérilisé. Chaque deux heures, les échantillons ont été prélevés de façon aseptique pour déterminer le pH à l'aide d'un pH-mètre portable (HANNA- HI 99161), l'acidité Dornic et les taux de croissance ;

Les prélèvements ont été effectués à 0h et toutes les 2 heures pendant 24h dont 1ml de chaque tube a été dilué dans 9 ml d'eau physiologique ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ). Les dilutions successives appropriées ont étéensemencées en masse, en utilisant le milieu MRS gélosé. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été retenues (figure 11).

### **I-12- Standardisation de l'inoculum de la souche cible (*S aureus*) dans les différents types de lait**

Afin de travailler dans les mêmes conditions, en termes de population bactérienne, la standardisation de l'*inoculum* est jugée indispensable.

L'inoculum de *S. aureus* est revivifié par ensemencement en stries sur gélose Chapman. Après incubation à 37°C pendant 24h, on ensemence deux colonies bien isolées et bien distinctes de la souche cible dans deux tubes stériles contenant 9 ml de lait et cela a été

effectué pour chaque type de lait (lait de vache, de chèvre et lait écrémé), puis incubés à 37°C pendant 18h (culture fraîche).

Au terme de la période d'incubation, des dilutions décimales sont effectuées dans de l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1ml des dilutions ( $10^{-7}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ) estensemencée en masse sur gélose nutritive. Un dénombrement est effectué après incubation à l'aide d'un compteur de colonies (suntex colony, conter 570).

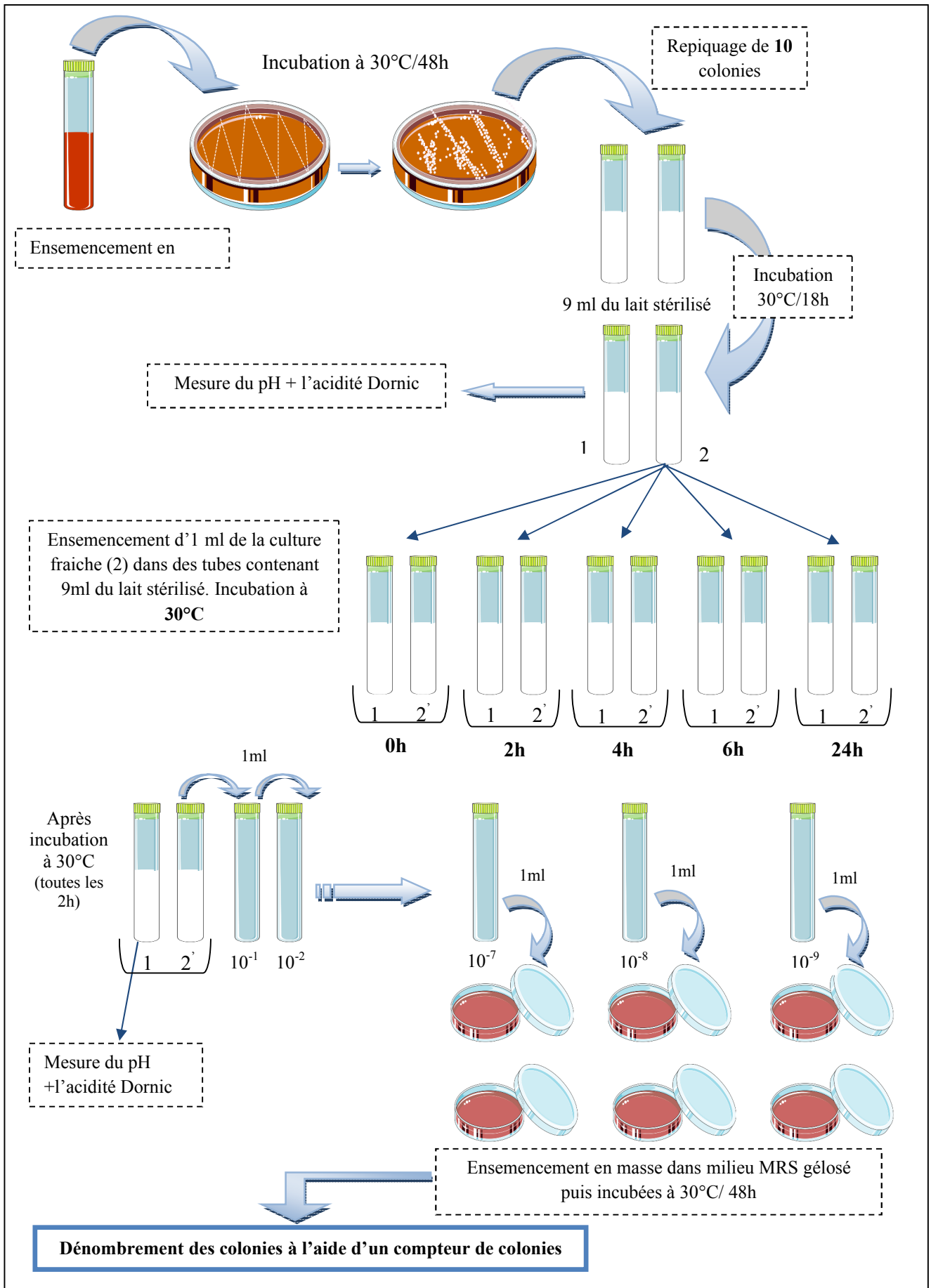


Figure 11 : Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche lactique (*Ln mesenteroides*)

### **I-13- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche cible (*S aureus*) dans les différents types du lait**

Le lait contient tous les nutriments nécessaires à la croissance de *S aureus*, l'acidité naturelle du lait est ainsi favorable (pH = 6,6). Dans cette partie nous avons étudié l'effet des différents laits, de la température d'incubation et du pH sur la croissance de *S aureus* dans le milieu lait.

A partir de la culture fraîche de la souche *S. aureus* (2 colonies dans 9ml du lait) obtenue après 18h d'incubation à 37°C, on ensemence 1ml dans des tubes contenant 9ml de lait. Une série de 10 tubes est ainsi préparés. Chaque deux heures, les échantillons ont été prélevés pour déterminer le pH, l'acidité Dornic et les taux de croissance. L'incubation est réalisée à 37°C ;

Des dénombrements sont réalisés toutes les 2h (0h, 2h, 4h, 6h et 24h). Après la période d'incubation, des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique, à partir de la dilution ( $10^{-7}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1ml de chaque dilution a été ensemencé en masse dans une gélose nutritive à raison de deux boîtes de pétri par dilution, puis incubées à 37°C/48h.

Le dénombrement des colonies est réalisé avec un compteur de colonie (Suntex 570). La figure 12 récapitule les étapes de l'étude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche *S. aureus* dans le lait.

#### **❖ Mesure du pH et de l'acidité Dornic produite**

La mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre portable (HANNA- HI 99161), L'acidité totale a été déterminée en titrant 10 ml de la culture avec la solution basique NaOH N/9 en utilisant l'indicateur de pH la phénolphtaléine. L'acidité a été exprimée en degré Dornic.

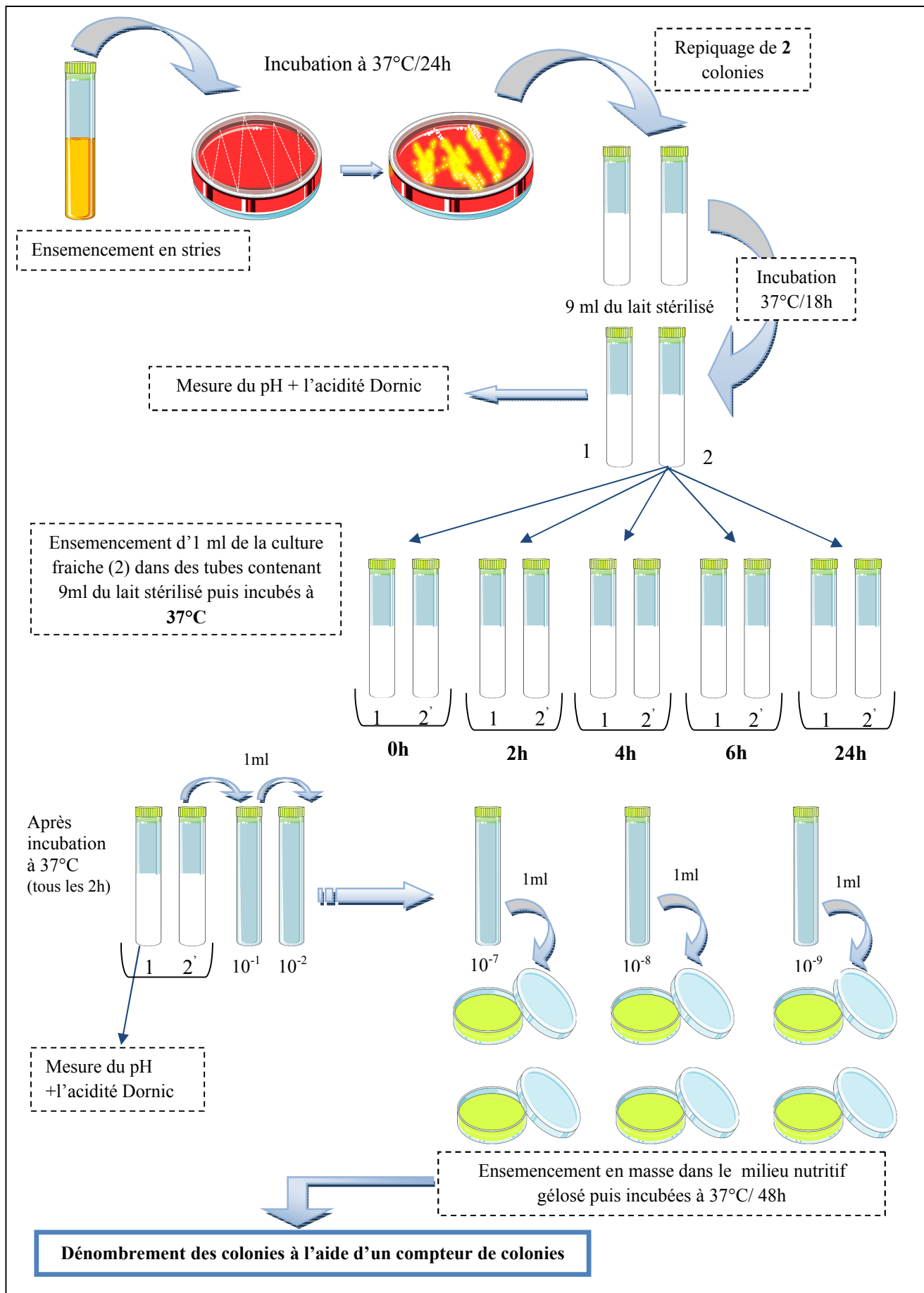


Figure 12 : Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de la souche cible (*S aureus*)

#### **I-14- Etude de l'effet antagoniste de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* en culture mixte dans les différents types de lait :**

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet des différents laits sur la croissance de la souche lactique *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* et l'effet du pH sur la croissance de *S. aureus*, et enfin déterminer l'activité antimicrobienne de la souche test en présence de *S. aureus*.

Cette activité est obtenue par incubation à une température constante proche de la température optimale de l'espèce bactérienne testée, Dans le cas de *Leuconostoc* celle-ci se situe entre 25°C à 30°C et pour *Staphylococcus aureus*, elle est de 37°C.

Les cultures fraîches (18h) des deux souches (la souche test *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* et la souche cible *S. aureus*) ont été préalablement préparées.

La culture mixte de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* et *Staphylococcus aureus* a été préparé par un ensemencement de 1ml ( $10^9$  UFC/ml) de la culture fraîche de la souche *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* (37) avec 1ml de la culture fraîche de *Staphylococcus aureus* ( $10^7$  UFC/ml), dans des tubes contenant 8ml du lait stérilisé. Ainsi une série de 10 tubes a été réalisée pour chaque type du lait, les dénombrements sont réalisés au moment de l'ensemencement (0h) et après incubation (2h, 4h, 6h et 24h) à 30°C pour la souche *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* (37) et à 37°C pour la souche *S. aureus* (A).

La gélose MRS est utilisée pour le dénombrement des bactéries lactiques et Chapman pour *S. aureus*.

Pour évaluer l'effet antagoniste de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* en co-culture avec *S. aureus* une mesure du pH et de l'acidité titrable a été effectuée au moment de l'ensemencement (0h) et répété tous les 2h (2h, 4h, 6h) et après 24h (figure 13).

Le dénombrement des colonies est réalisé avec un compteur de colonie (Suntex 570).

#### **I-15- Etude statistique**

Une étude statistique par le test ANOVA (logiciel STATISTICA) a été réalisée pour tous les résultats obtenus (étude de la cinétique de la croissance et du pouvoir acidifiant de la souche test (*Ln. mesenteroides*) et de la souche cible (*S. aureus*) en culture pure puis en culture mixte (intervalle d'erreur : 5%).



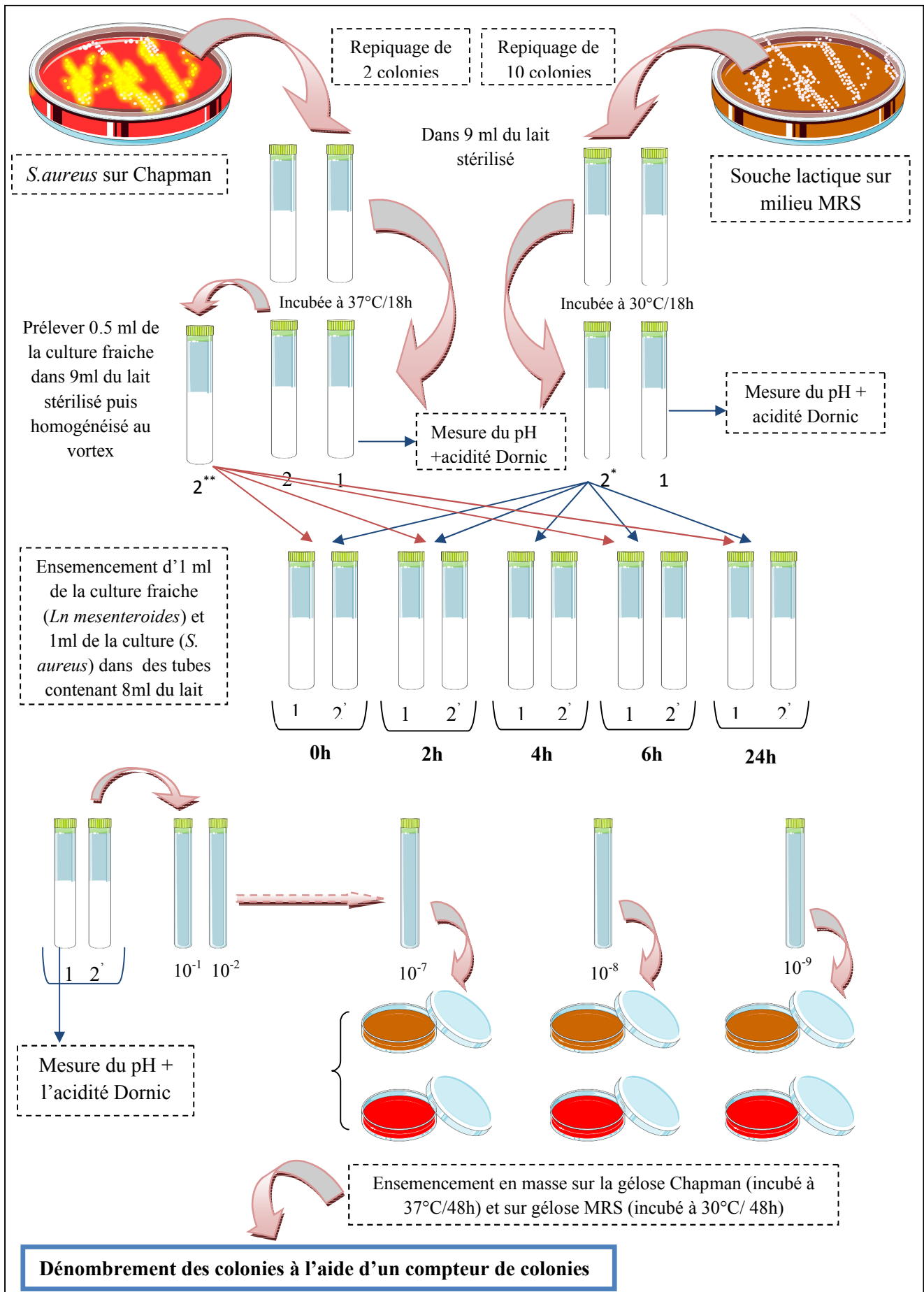
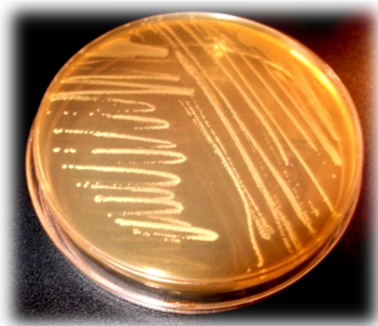


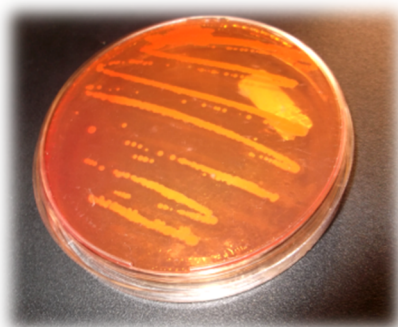
Figure 13 : Etude de l'activité antagoniste de *Ln mesenteroides* dans les différents types du lait

**II-1- Vérification de la pureté des souches *Leuconostoc* testées**

- Les observations macroscopiques (aspect des colonies) ont révélé de petites colonies blanchâtres, bombées (Figure 14) et l'observation macroscopiques de l'aspect des cellules a montré des cellules régulières, ovoïdes sous forme des coques groupées en paires ou en courtes chaînes et immobiles.
- L'observation microscopique de la coloration de Gram a donné des colonies violettes, signifiant que les *Leuconostoc*s sont des cocci à Gram positif.
- Test catalase (Figure 15) est négative (absence d'effervescence).

**Figure 14: Aspect des colonies sur gélose MRS****Figure 15 : Test catalase****II-2- Vérification de la pureté de la souche cible *Staphylococcus aureus***

- Les observations macroscopiques (aspect des colonies) ont révélé des colonies sphérique entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol (mannitol +) (Figure 16) et l'observation macroscopiques de l'aspect des cellules a montré des coques en amas réguliers, grappe de raisin.
- L'observation microscopique de la coloration de Gram a donné des colonies violettes, signifiant que *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif.
- Test catalase (Figure 17) est positive (présence d'effervescence)  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

**Figure 16: Aspect des colonies sur gélose Chapman****Figure 17: Test catalase**

## II-3- Evaluation de la qualité hygiénique des échantillons du lait

### II-3-1- Mesure du pH et de l'acidité titrable

Le pH d'un lait normal varie entre 6,5 et 6,7 pour le lait de vache, et entre 6,3 et 6,5 pour le lait de chèvre ; on considère comme anormale les valeurs de pH inférieur à 6,3 et supérieur à 6,9. L'acidité Dornic est exprimée en degré Dornic. Au moment de la traite, elle varie de 12 à 14°D. Cette acidité naturelle est fonction du stade de lactation, elle est liée à la teneur en caséine, sels minéraux, ions. En fin de lactation, elle est de 16 à 18°D.

**Tableau III** : Valeurs du pH et de l'acidité Dornic

Type de lait analysé	Valeurs du pH		Valeurs de l'acidité Dornic	
	Résultats	Normes selon FAO, 1998	Résultats	Normes selon FAO, 1998
Lait de vache	6,8	6,6	13°D	15 – 17
Lait de chèvre	6,7	6,4	14°D	14 - 18
Lait en poudre écrémé	6,85	6,7	13°D	Max 18

### II-3-2- Mesure de divers paramètres physico-chimiques

Les analyses physicochimiques des différents laits utilisés dans cette étude ont été réalisées à la laiterie Candia, les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau IV** : Résultats d'analyse de divers paramètres physico-chimique des trois différents types du lait

Divers paramètres	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	Résultats	Normes FAO, 1998	Résultats	Normes FAO, 1998	Résultats	Normes FAO, 1998
Teneur en lactose	52,4 g/l	48g/l	49,4 g/l	48g/l	44,6 g/l	48g/l
Taux de protéines	41,3 g/l	32 g/l	37,6 g/l	30,8 g/l	25,5 g/l	35,7 g/l
Taux de matière sèche	150g/l	128 g/l	156,3 g/l	134 g/l	80,6 g/l	107_112 g/l
Point de congélation	-0,59	-0,52_ -0,55	-0,57	-0,55 _ -0,583	-0,5	-0,530_ - 0,555
Teneur en matières grasses	49,1 g/l	40,5 g/l	61,3 g/l	34,4 g/l	0 g/l	1,5 g/l
Taux de matière sèche dégraissé	101,4 g/l	91 g/l	96,8 g/l	116_ 134 g/l	81,6 g/l	85 g/l

Odeur	Faible	Faible	Neutre	Neutre	Neutre	Neutre
Aspect	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène	Homogène
Couleur	Blanc jaunâtre	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc

Le taux de la matière grasse (MG) varie en fonction des conditions d'élevage. C'est le constituant le plus variable du lait et la cause la plus répandue d'une faible teneur en MG est le régime qui renferme une faible proportion de fourrage et un taux élevé de concentré (**kebchaoui , 2012**), et l'examen des résultats mentionnés dans le tableau IV le taux de MG, et le point de congélation se situe dans l'intervalle donc présente une conformité aux normes. Le lait écrémé se distingue des deux autres types du lait par sa teneur particulière en matière grasse (0 g/l).

Pour le lait de vache et de chèvre on enregistre des valeurs de taux de protéines, en matière sèche, en MG et le taux de l'extrait sec dégraissé supérieurs aux normes recommandées et la différence entre le lait de vache et le de chèvre n'est pas très importante. Il apparaît que la teneur en matière sèche du lait écrémé est généralement la plus faible, d'après le résultat indiqué dans le tableau IV nous observons que la valeur de la teneur en matière sèche n'est pas conforme aux normes. La diminution de la teneur en matière sèche totale est due notamment à une réduction de la poudre de lait écrémé lors de la reconstitution du lait. Le lait de vache et de chèvre sont caractérisés par une teneur en matière sèche totale supérieure aux normes. Le taux de protéines est très important dans le lait de vache et le lait de chèvre car elle représente une valeur supérieure aux normes, et les protéines sont une partie essentielle de notre régime alimentaire.

Les différents types de lait ont des caractères satisfaisants, la couleur blanche, l'aspect, le goût et l'odeur sont conformes, ce qui conclue que le lait a une bonne qualité organoleptique. Le lait doit être propre c'est à dire ne pas contenir d'éléments figurés (**Mamadou, 1991**).

### II-3-3- Analyse microbiologique des échantillons de lait cru de vache et de chèvre

L'analyse réalisée aux échantillons consiste en un dénombrement de la flore totale aérobie mésophile, les coliformes totaux, les Entérobactéries, les levures et moisissures, les Salmonelles et les bactéries lactiques ; et pour les Staphylocoques, ils ont été recherchés dans le lait de vache et dénombrés dans le lait de chèvre.

Le lait au cours de la traite et du transport, peut être contaminé par une grande variété de microorganismes (Figure 18 et 19) Une partie seulement d'entre eux peut se multiplier dans le lait si la température leur est favorable et le milieu propice. Il en résulte que la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variable d'un échantillon à l'autre et suivant l'âge du lait.

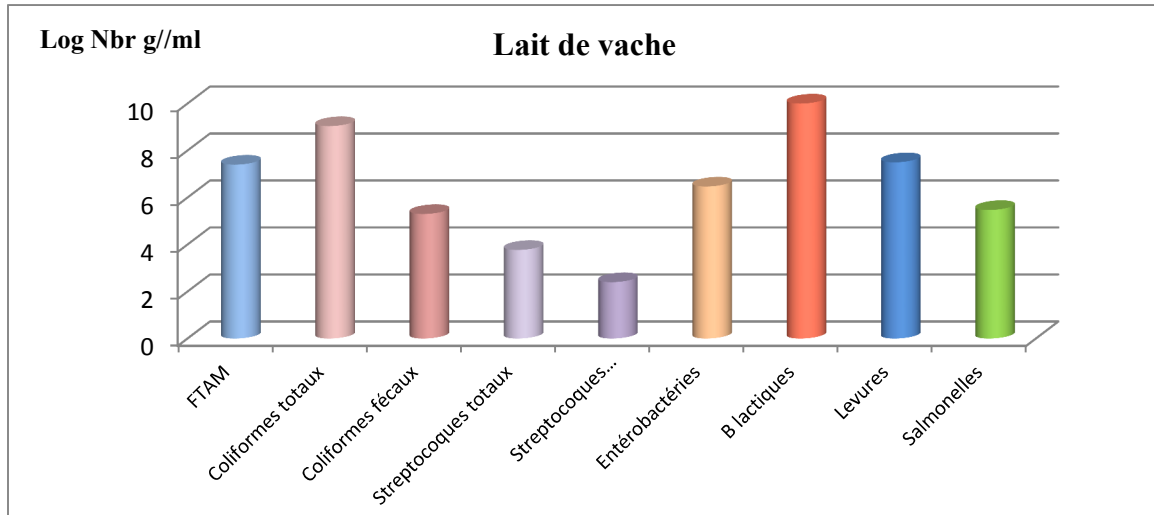


Figure 18 : Résultats de l'analyse microbiologique du lait de vache

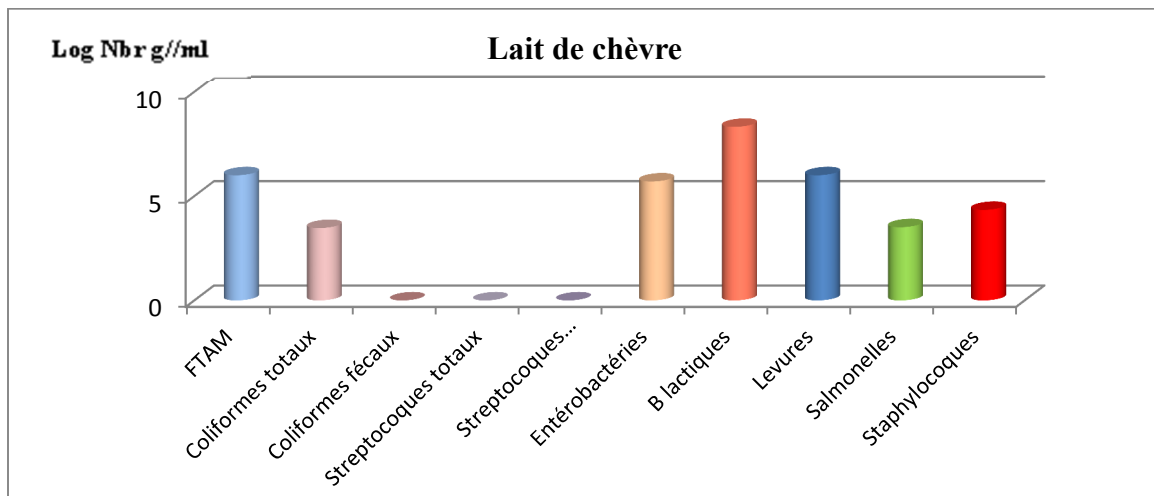


Figure 19 : Résultats de l'analyse microbiologique du lait de chèvre

En se référant aux normes Algériennes obtenue de l'arrêté interministériel issu de J.O.R.A (Journal Officiel de la République Algérienne) n°35 du 27 Mai 1998 (Aoul Safar 1419).

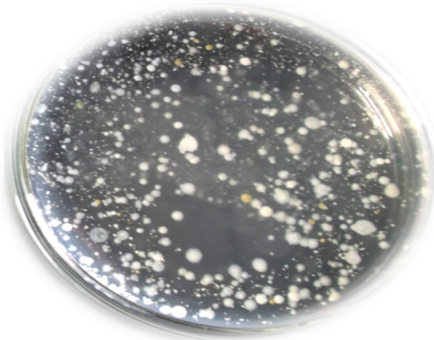
La présence de *S. aureus*, Salmonelle, les coliformes fécaux et des Streptocoques dans les échantillons de lait analysés témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique (Tableaux V).

**Tableau V** : Résultats des analyses microbiologiques du lait de vache et chèvre utilisés

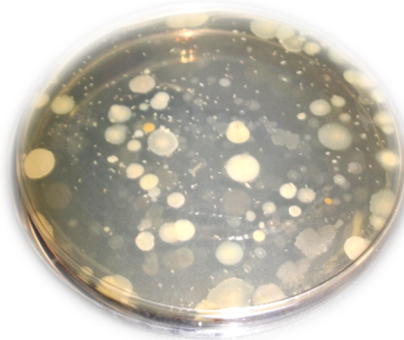
Germes	M (UFC/ml)	Lait de vache (UFC/ml)	Lait de chèvre (UFC/ml)
FTAM	$10^5$	$25 \cdot 10^6$	$10^6$
Coliformes fécaux	$10^3$	$2 \cdot 10^5$	Abs
Streptocoques fécaux	Abs/0,1 ml	250	Abs
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	$3 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^4$
Salmonelles	Abs	$3 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^3$

### 1. La flore FTAM

La flore microbienne totale quantifiée lors des analyses du lait sous le terme « flore totale » représente un aperçu de l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans l'échantillon de lait. Nos analyses montrent que l'échantillon de lait cru de vache a un taux élevé de la FTAM estimé à  $25 \cdot 10^6$  UFC/ml tandis que pour le lait de chèvre il est de l'ordre de  $10^6$  UFC/ml, en comparant aux normes recommandées, les résultats obtenus indiquent une mauvaise qualité d'hygiène et une contamination des échantillons analysés.



**Figure 20:** Aspect de la FTAM du lait de vache sur gélose PCA



**Figure 21:** Aspect de la FTAM du lait de chèvre sur gélose PCA

### 2. Les coliformes totaux et fécaux

Les résultats obtenus (Figure 18), montrent la présence d'un taux très élevé de coliformes totaux ( $11 \cdot 10^8$  UFC/ml) et la présence d'un taux important de Coliformes fécaux ( $2 \cdot 10^5$  UFC/ml) qui dépasse la norme recommandée, ce nombre élevé s'explique par les mauvaises conditions d'hygiène et non respect des bonnes conditions de traite. Cela était prévisible dans la mesure où le lait après la traite est le plus souvent souillé par des germes

d'origines fécales (**Cyrille Ngassam Tchamba, 2007**). En dehors de la source fécale, la contamination du lait peut être due à une contamination de l'eau utilisée pour les différentes opérations de nettoyage ou au matériel lui-même (**Sommelier et Heuchel, 1999**).

Pour le lait de chèvre (Figure 19), on note la présence de coliformes totaux à un taux de  $6.10^3$  UFC/ml et une absence de Coliformes fécaux.

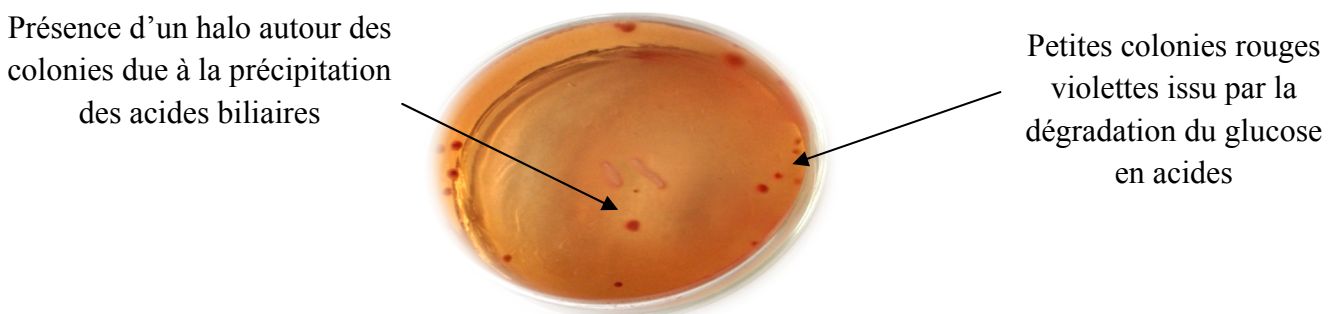
### 3. Les Streptocoques totaux et fécaux

Se sont des bactéries qui font parti de la flore intestinale de l'homme. Leur présence est fréquente dans le lait et les produits laitiers. Elle témoigne d'une contamination fécale récente. La présence des Streptocoques fécaux dans le lait de vache (250 UFC/ml) est expliquée par un manque d'hygiène chez les éleveurs (**Hajj Semaan et al, 2001**). Contrairement au lait de vache, on note une absence totale de Streptocoques fécaux dans le lait de chèvre.

### 4. Les Entérobactéries

Le dénombrement des *Enterobacteriaceae* se substitue au dénombrement des coliformes thermotolérants (**Guy Leyral et al, 2002**).

La présence des entérobactéries dans les échantillons de lait analysés est élevée :  $3.10^6$  UFC/ml dans le lait de vache et  $5.10^6$  UFC/ml dans le lait de chèvre, il est considéré généralement comme un indicateur de mammite ou de mauvaises conditions d'hygiène au cours de lactation. Leur présence (Figure 22) révèle une contamination probable à partir des animaux, du trayeur ou de matériel (**Tabet, 2009**).



**Figure 22** : Aspect des colonies des Entérobactéries sur milieu VRBG

### 5. Les levures et moisissures

Les résultats des analyses microbiologiques obtenues (figure 18 et 19) révèlent la



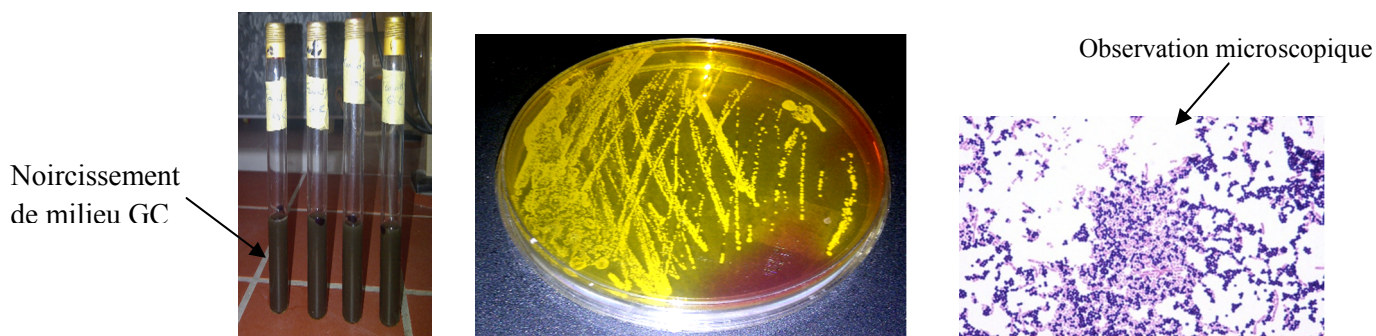
présence des levures estimée à  $3,18 \cdot 10^7$  UFC/ml dans le lait de vache et à  $10^6$  UFC/ml dans le lait de chèvre. On note une absence de moisissure dans tous les échantillons de lait. Les levures associées aux laits sont les espèces suivantes : *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* (Bourgeois et al, 1996). La présence de ces micro-organismes dans le lait, à des niveaux excessifs, peuvent provoquer des accidents de fabrication : dégradation du goût, gonflement, mauvaise présentation.

Les résultats de l'observation microscopique à l'état frais des colonies obtenus après croissance sur gélose Sabouraud à 37°C/24h montrent qu'il s'agit des levures.

## 6. Staphylocoques

On note que l'échantillon de lait de chèvre a été contaminé par les staphylocoques présumés pathogènes et que le taux de contamination moyen ( $2,3 \cdot 10^4$  UFC/ml) et qui est supérieur à la valeur indiquée par la norme Algérienne (Abs). Les Staphylocoques sont présents au niveau de la peau de la mamelle et des trayons et peuvent donc coloniser les blessures des trayons et l'intérieur de la mamelle. On qualifie les staphylocoques de germes pathogènes à réservoir mammaire puisque les quartiers infectés, les plaies, les gerçures sont les principaux réservoirs et les microbes sont transférés dans les trayons sains à l'occasion de la traite. Étant donné son habitat et sa fréquente mise en cause dans les mammites, la présence de staphylocoques dans le lait paraît quasi inévitable (Fatet, 2005).

Pour le lait de vache, les résultats observés après incubation de milieu Giolitti Cantoni sont montrés dans la figure 23. Un noircissement est apparu dans tous les tubes et suspecté la présence de *S. aureus*. Un isolement à partir du milieu GC a été réalisé sur gélose sélective (Chapman) nous donne un virage de couleur vers le jaune qui est due à l'acidification du milieu par fermentation du mannitol. Une observation microscopique de la coloration de Gram a révélé des amas en grappes de raisins (coques), indique probablement qu'il s'agit de *S. aureus*.



**Figure 23:** Résultats de recherche de *S. aureus* dans le lait de vache



*S. aureus* est disséminé sur la peau et les mains des manipulateurs de façon temporaire ou permanente. L'homme est considéré comme le vecteur principal de contamination au cours des manipulations. Il faut noter que la présence des staphylocoques dans le lait peut être à l'origine de nombreuses intoxications alimentaires, donc très dangereux pour le consommateur.

## 7. Les Salmonelles

Les résultats obtenus montrent la présence d'un taux très élevé de Salmonelles dans le lait de vache ( $3.10^5$ UFC/ml) et dans le lait de chèvre il est de l'ordre  $3,3.10^3$  UFC/ml, La contamination du lait cru par les Salmonelles est le plus souvent d'origine externe (**Brisabois et al, 1997**). L'intestin des animaux constitue le réservoir le plus important en salmonelles et contribue fortement à leur dissémination dans l'environnement où elles peuvent survivre mais sans se multiplier. *Salmonella* est l'une des causes de toxi-infection alimentaire.

## 8. Les Bactéries lactiques

On note une nette domination des bactéries lactiques sur la flore de contamination dans les échantillons de lait. La flore de contamination quant à elle est marquée par les Coliformes qui dominant sur les Staphylocoques et les Salmonelles, bien que celle-ci soit insignifiante par rapport aux bactéries lactiques. Elles sont estimées à  $1,25.10^9$ UFC/ml dans le lait de vache et ( $2.1.10^8$  UFC/ml) dans le lait de chèvre. Les bactéries lactiques regroupent des espèces de genre *Lactobacillus*, *Leuconostocs* et *Lactococcus*.

Les résultats d'analyses microbiologiques des échantillons du lait montrent que ces derniers sont non satisfaisants, et cela est dû probablement aux mauvaises conditions d'hygiène et non respects des bonnes pratiques de la traite.

### II-4- L'activité antibactérienne *in vitro* des souches de *Leuconostoc*

#### II-4-1- Test de spot

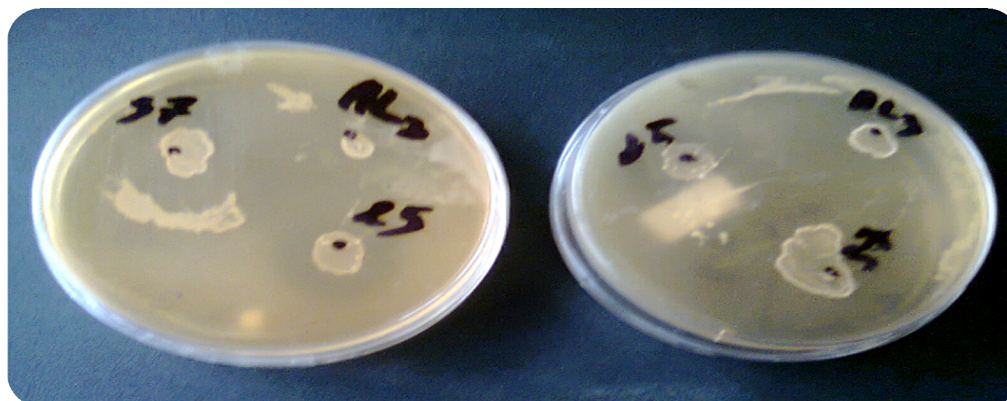
Les deux souches de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* (37 et Al<sub>3</sub>) et la souche *Ln mesenteroides ssp cremoris* (25) ont été testées à l'égard de *S aureus* (A) (Tableau VI).

Les résultats ont montré que les trois souches de *Ln mesenteroides* sont capables de synthétiser des substances antibactériennes à l'égard de *S. aureus*. Ceci se manifeste par l'apparition de zones claires autour des spots.

**Tableau VI : Résultats des tests de spots**

Souches tests	Diamètre (mm) des zones d'inhibitions des souches cibles
<i>Ln mesenteroides ssp mesenteroides</i> 37	50
<i>Ln mesenteroides ssp cremoris</i> 25	30
<i>Ln mesenteroides ssp mesenteroides</i> Al <sub>3</sub>	45

Toutes les souches tests utilisées pour l'antagonisme direct, ont donné des zones d'inhibition à l'égard de *S. aureus*. Cependant, la souche Al<sub>3</sub> semble présenter une zone d'inhibition plus réduite que les autres souches (25 et 37), *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* 37 témoigne de la meilleure activité antibactérienne envers *S. aureus* (A) avec un diamètre de zones d'inhibition de 50 mm (Figure 24) elle sera donc retenue pour la suite de l'étude.



**Figure 24 : Test des spots**

L'antagonisme des bactéries lactiques envers la souche *S. aureus* est dû probablement, à la synthèse de plusieurs composés antibactériens, à savoir : des acides organiques (lactique, acétique), le dioxyde de carbone, le diacétyle, l'éthanol ou encore des composés protéiques assimilables aux bactériocines (Messens et de Vuyst, 2002).

L'action inhibitrice des *Leuconostocs* est due à la présence d'acides organiques et principalement de l'acide acétique. Daly et al, (1972) avaient constaté que le milieu de culture contenant de l'acide acétique inhibait le développement de *Staphylococcus aureus*.

Les *Leuconostocs*, principalement *Ln. cremoris*, en association avec des bactéries lactiques mésophiles sont capables d'inhiber la croissance de microorganismes pathogènes tel *S. aureus* ou de bactéries psychrotrophes. Les filtrats de culture sur bouillon MRS de sept souches de *Leuconostocs* producteurs de dextrans sur 35 essayées inhibaient la croissance de deux souches de *Pseudomonas fluorescens* (Devoyod et al, 1988).

*Ln. cremoris*, *Ln. dextransicum*, *Str. cremoris*, *Str. lactis*, et *Str. lactis subsp. diacetylactis*, sont des microorganismes communs des levains lactiques présentant une antibiose bénéfique. Elles provoquent l'inhibition d'autres bactéries pathogènes ou des microorganismes capables d'altérer les produits laitiers (Devoyod et al, 1988).

## II-5- Standardisation des inoculas 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.

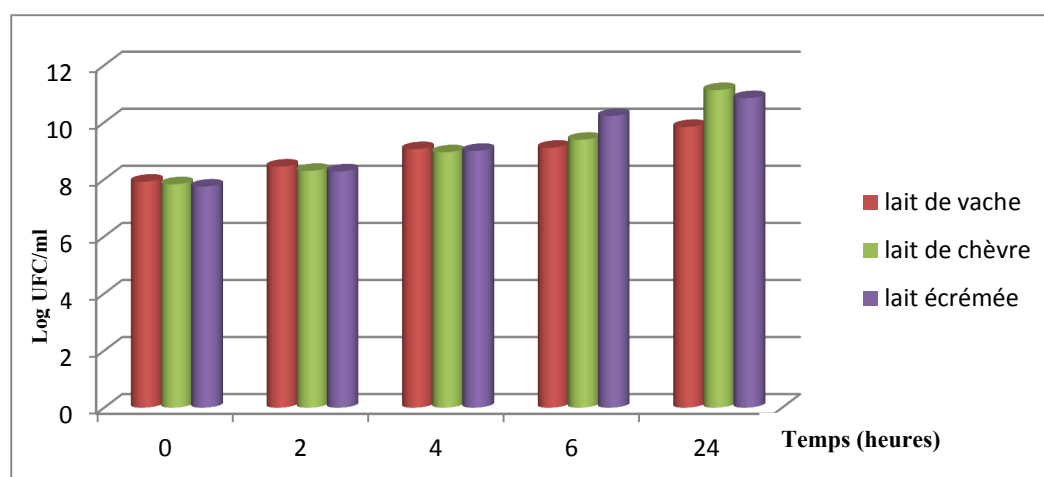
La standardisation de *Leuconostoc mesenteroides* a été réalisée par le repiquage de 8 colonies de 48 h sur gélose MRS dans les différents types de lait. Pour la souche cible *S. aureus* 2 colonies de 24 h sur gélose GN sont repiquées dans les différents types de lait. Après incubation pendant 18h (*Ln mesenteroides* à 30°C) et (*S. aureus* à 37 °C) le résultat du dénombrement effectué est présenté dans le tableau VII suivant :

**Tableau VII** : Résultats de la standardisation des souches étudiées

Type de lait \ Souche	<i>Ln. mesenteroides ssp mesenteroides</i>	<i>S. aureus</i>
Lait de vache	8,4 10 <sup>8</sup>	7,75 10 <sup>8</sup>
Lait de chèvre	6,9 10 <sup>8</sup>	1 10 <sup>8</sup>
Lait écrémé	5,6 10 <sup>8</sup>	3,25 10 <sup>8</sup>

## II-6- Etude de la cinétique de croissance et d'acidification de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types du lait

La croissance de la souche 37 en culture pure dans les différents types de lait (lait de vache, de chèvre et lait écrémé qui ont été préalablement stérilisés) a été suivie. Les résultats du dénombrement, de l'acidité Dornic ainsi que de l'évolution du pH sont représentés dans les figures 25, 26 et 27 respectivement.



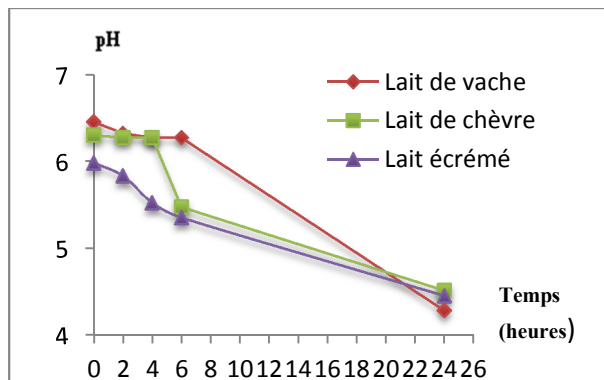
**Figure 25 :** Cinétique de croissance de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types du lait

Les résultats obtenus dans la figure 25 montrent que le nombre de cellules viable de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* en culture pure ne cesse d'augmenter durant toute la période d'incubation dans les trois types de lait.

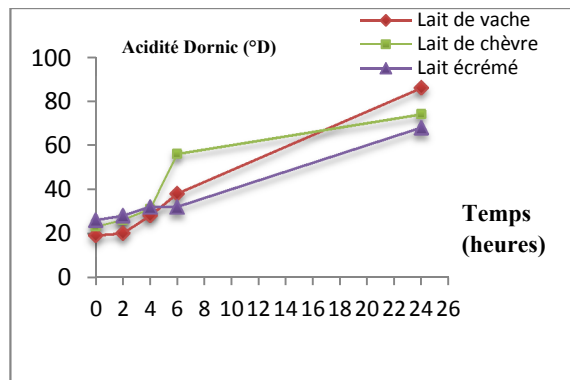
Pour ces derniers, une augmentation progressive est enregistrée, à 0h, la concentration de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* était de  $8,4 \cdot 10^7$  UFC/ml dans le lait de vache,  $6,9 \cdot 10^7$  UFC/ml dans le lait de chèvre et  $5,6 \cdot 10^7$  UFC/ml dans le lait écrémé. Cependant dans les trois types de lait, une phase d'adaptation caractérisée par une légère augmentation est observée, elle s'étale sur un intervalle de temps de 0 à 4h. Après 4h d'incubation, le nombre de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* atteint une valeur de  $1,67 \cdot 10^{10}$  UFC/ml dans le lait écrémé tandis que dans le lait de vache et de chèvre ils sont de l'ordre de  $1,3 \cdot 10^9$  UFC/ml et  $2,5 \cdot 10^9$  UFC/ml respectivement. Au bout de 24h une forte augmentation du nombre de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* est observée dans le lait de chèvre elle est estimée à  $1,37 \cdot 10^{11}$  UFC/ml. Dans le lait écrémé, ce nombre atteint une valeur de  $7,1 \cdot 10^{10}$  UFC/ml et pour le lait de vache une faible augmentation est observée, on dénombre  $7 \cdot 10^9$  UFC/ml.

A l'intervalle de temps de 0h à 4h (Figure 26), on note une diminution progressive approximativement stable du pH allant de 6,45 (à 0h) dans le lait de vache et de 6,3 (à 0h) dans le lait de chèvre jusqu'à 6,27 (à 4h). Après 4h d'incubation, le pouvoir acidifiant est plus élevé dans le lait de vache par rapport au lait de chèvre. Au bout de 24h, le pH du lait de chèvre atteint 4,51 et dans le lait de vache le pH atteint 4,28. La mesure du pH du lait écrémé

stérilisé montre une diminution progressive allant de 5,98 (à 0h) jusqu'à 4,45 à la fin de la période d'incubation.



**Figure 26:** Résultats de la mesure du pH de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* en culture pure dans les différents types du lait



**Figure 27:** Résultats de la mesure de l'acidité Dornic de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* en culture pure dans les différents types du lait

La diminution du pH dans les trois laits engendre une augmentation de l'acidité Dornic. Cette dernière atteint 74°D dans le lait de chèvre et 86 °D dans le lait de vache et 68°D dans le lait écrémé.

L'étude statistique de la cinétique de croissance, l'évolution du pH et de l'acidité Dornic de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* dans les trois types du lait, a révélé une diminution du pH suivie de l'augmentation de l'acidité Dornic dans chaque type de lait avec une différence non significative après 24h d'incubation (Tableau I, IV et VII, annexe IV).

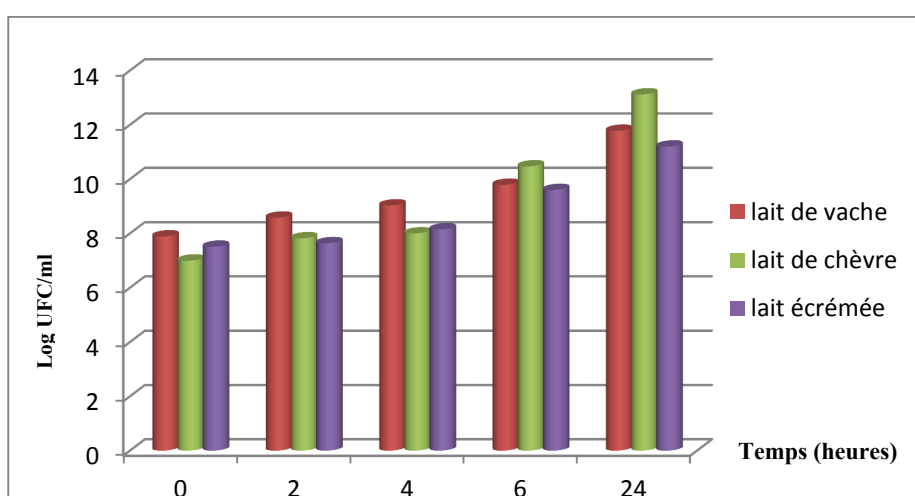
Néanmoins, les résultats obtenus montrent un bon pouvoir acidifiant dans les trois types de lait, ce qui est un caractère technologique très important pour l'utilisation d'un ferment

**Zarour et al en 2012** ont étudié la cinétique de croissance, d'évolution de pH, de l'acidité Dornic et de production de CO<sub>2</sub>, de deux sous-espèces de *Leuconostoc* dans le lait écrémé. Cette étude a révélé que *Ln. mesenteroides subsp dextranicum* a une vitesse de croissance, une activité acidifiante et gazogène plus élevées que celles de *Ln. mesenteroides subsp mesenteroides*. Le suivi des mêmes paramètres pendant 24h en cultivant la sous-espèce *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* en milieu lait additionné de différentes concentrations d'extrait de levure a permis de déduire que ce composant stimule le

développement bactérien, la production gazeuse et la production de l'acide lactique chez les *Leuconostocs*.

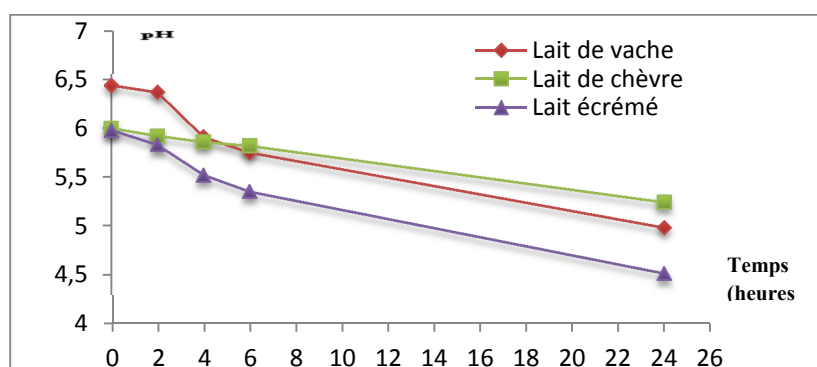
## II-7- Etude de la cinétique de croissance de *S. aureus* en culture pure dans les différents types de lait

Les résultats du suivi de la croissance de la souche de *S. aureus* dans les trois types de laits stérilisés ainsi que le suivi du pH et de l'acidité Dornic sont présentés dans les figures 28, 29 et 30 respectivement.

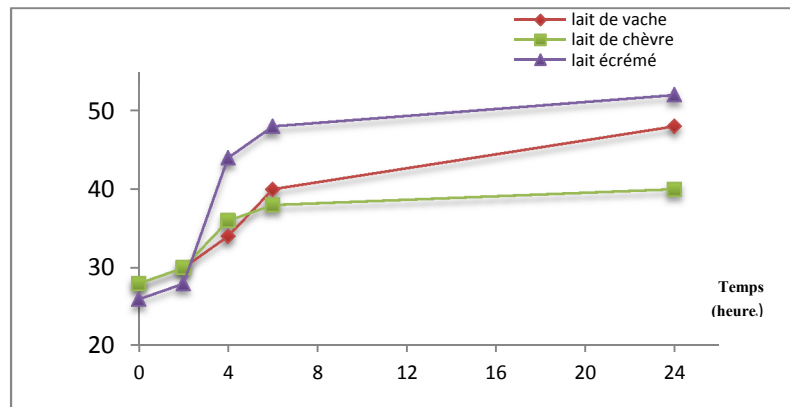


**Figure 28 :** Cinétique de croissance de *S. aureus* en culture pure dans les différents types de lait

Les résultats rapportés dans la figure 28 montrent que la souche *S. aureus* en culture pure présente une augmentation progressive dans les trois laits. La phase exponentielle a révélé dès le début de la culture. Après 24h d'incubation, la concentration cellulaire de *S. aureus* atteint  $6,07 \cdot 10^{11}$  UFC/ml dans le lait de vache,  $1,32 \cdot 10^{13}$  UFC/ml dans le lait de chèvre et  $1,6 \cdot 10^{11}$  UFC/ml dans le lait écrémé. Le nombre de *S. aureus* est hautement supérieur dans le lait de chèvre.



**Figure 29:** Résultats de la mesure du pH de *S. aureus* en culture pure dans les différents types de lait



**Figure 30:** Résultats de la mesure de l'acidité Dornic de *S. aureus* en culture pure dans les différents types de lait

La mesure du pH de *S. aureus* en culture pure dans les différents types de lait montre une diminution progressive. Néanmoins aucune différence significative n'a été enregistrée, (la valeur de  $F_c$  est inférieure à la valeur  $F$  théorique (Tableau V, annexe IV). Après 24h d'incubation, les pH des laits de chèvre, de vache et écrémé sont: 5,85, 4.3 et 4,53 respectivement.

La croissance positive de la souche *S. aureus* à 37°C dans les différents types de lait peut s'expliquer par les conditions favorables de croissance et la richesse du milieu (lait) par les facteurs de croissance de cette dernière, tel que le pH et la température.

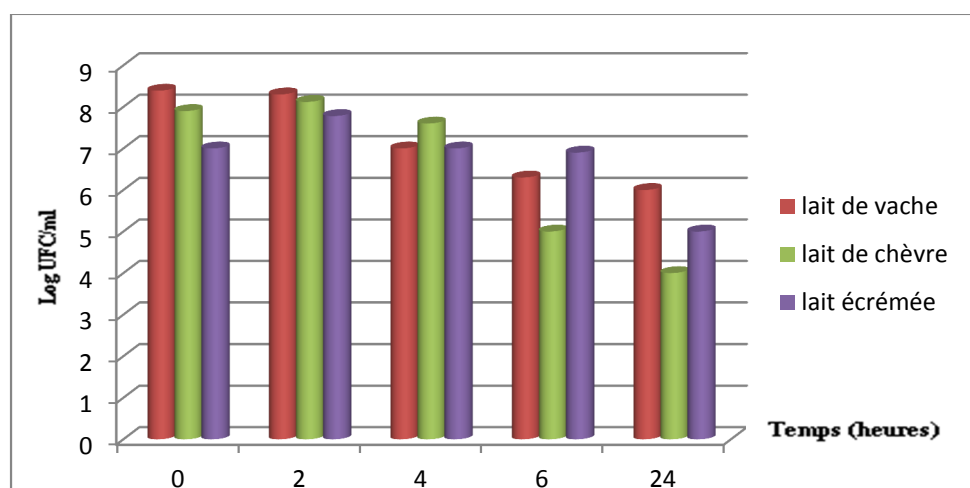
**Le Mens et al en 1999** ont étudié la croissance de *S. aureus* dans du lait UHT et l'effet de l'acidification de lait cru au début de process sur l'inhibition de la croissance de *S. aureus* et ils ont montré que la croissance de *S. aureus* est inhibée par la production d'acide lactique obtenue en 3 à 4 h d'incubation. Ils ont aussi constaté que les *S. aureus* ne se développe pas à la température de 12°C dans du lait UHT après 16h d'inoculation. Les données de la littérature indiquent cependant une température de croissance possible de *S. aureus* à 6°C.

Le lait traité thermiquement est plus favorable à la croissance de *S. aureus* que le lait cru, car ce micro-organisme est un mauvais compétiteur en présence d'autres flores bactériennes. Dans le lait cru, le nombre initial de *S. aureus* doit être égal ou supérieur à celui de la flore concomitante pour pouvoir se multiplier suffisamment et produire des enterotoxines (**Brisabois et al, 1997**).

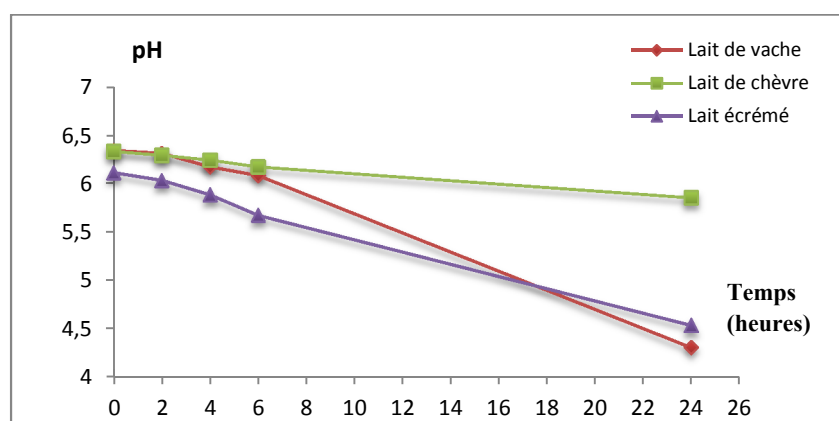
## II-8- Etude de l'antagonisme de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* envers *S. aureus* dans les différents types de lait

L'étude de l'antagonisme *in vitro* de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* à l'égard de *S. aureus* a été effectuée en cultures mixtes dans les différents types de lait (lait de vache, de chèvre et lait écrémé).

Le dénombrement et la mesure du pH ont été effectués toutes les deux h pendant 24h .La figure 31 nous montre que la souche lactique *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* a provoqué une inhibition importante de la croissance de *S. aureus* dans chaque types de lait. Ces résultats indiquent l'existence d'agents d'inhibition produits par *Ln mesenteroides ssp mesenteroides*.

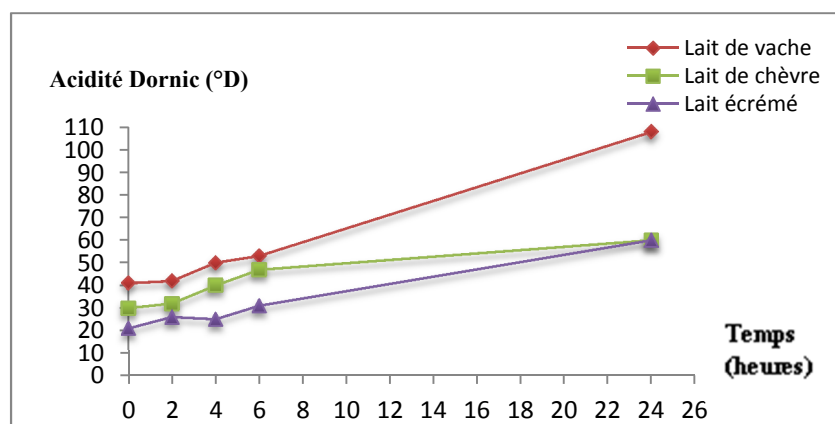


**Figure 31** : Cinétique de croissance de *S. aureus* en culture mixte avec *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types de lait



**Figure 32** : Evolution du pH de la culture mixte de *S. aureus* avec *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types de lait





**Figure 33** : Evolution de l'acidité de la culture mixte de *S. aureus* avec *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types du lait

Les résultats illustrés dans les figures 32 et 33 confirment l'effet antagoniste de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* sur la croissance de *S. aureus* et cela est expliqué par l'abaissement du nombre de *S. aureus* avec une diminution de quatre unités logarithmiques dans le lait de chèvre et deux unités logarithmiques dans le lait de vache et écrémé. En effet, on remarque que la cinétique de croissance de *S. aureus* en présence de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* est stable pendant 2h dans le lait de vache et le lait de chèvre, mais son taux commence à diminuer après 2h de façon continue pour ces deux types de lait et arrive au bout de 24h à  $6.10^5$  UFC/ml dans le lait de vache et à  $4.10^5$  UFC/ml dans le lait de chèvre. En ce qui concerne le lait écrémé, durant les 2h d'incubation, une augmentation légère du nombre de *S. aureus* est enregistrée, une phase de stabilité est observée entre 4h et 6h et le nombre de *S. aureus* diminue au bout de 24h à  $5.10^5$  UFC/ml.

L'étude statistique de la croissance de *S. aureus* en présence de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* dans les trois types du lait, a révélé une différence non significative avec une valeur de F calculée inférieure à la valeur théorique (Tableau III, annexe IV).

Le pH des laitsensemencés avec *S. aureus* associés à *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* est en diminution progressive avec une différence non significative (Tableau IV, annexe IV). Après 24h d'incubation, les valeurs du pH diminuent respectivement de 6,33 à 5,85 pour le lait de chèvre, de 6,11 à 4,53 pour le lait écrémé et de 6,34 à 4,3 pour lait de vache.

Cette diminution peut être interprétée par l'effet antagoniste de la souche de *Ln mesenteroides ssp mesenteroides* à l'égard de *S. aureus*, on suppose donc cette souche a

produit des substances ou des métabolites qui inhibent la croissance de *S. aureus*.

En effet, des études ont montré que l'acidification du milieu de culture ou du lait par addition d'acide lactique jusqu'à un pH de 4,5 - 4,4 inhibait complètement la croissance de *S. aureus* (Charlier et al, 2009). Néanmoins en plus de la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques (lactique et acétique) envers *S. aureus* résultait de l'action de leur forme non dissociée. Effectivement, la forme non dissociée de l'acide peut traverser facilement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération de protons, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions (Caplice et Fitzgerald, 1999). Cependant dans cette étude les pH des cultures mixtes de la souche *S. aureus* (A) dans le lait de vache, de chèvre et lait écrémé en présence de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* est respectivement 4,93, 5,85, 4,53 après 24h d'incubation. *S. aureus* peut croître à des pH entre 4,6 et 10 avec une croissance optimale à un pH neutre (Charlier et al, 2009). Si le pH ne joue qu'un rôle mineur dans le phénomène d'inhibition de *S. aureus* on peut supposer que l'effet inhibiteur de sa croissance est dû à l'accumulation d'autre substance anti- Staphylococciques produites par *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides*.

Marth en 1962, Marth et Hussong en 1963 ont montré que des filtrats de culture sur lait écrémé de *Ln. citrovorum* inhibaient des souches d'*Aerobacter aerogenes*, d'*Escherichia coli*, de *Pseudomonas fluorescens* et de *Pseudomonas fragi* et que l'inhibition dépendait à la fois des souches de *Ln. citrovorum* cultivées et des souches de microorganismes essayées. Par contre aucun filtrat ne présentait d'action inhibitrice vis-à-vis de *Torula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis* et *Mycotorula lipolytica*. D'autres auteurs Daly et al en 1972 ont émis l'hypothèse que l'eau oxygénée pouvait jouer un rôle dans ces phénomènes d'inhibition. La production d'acides organiques et (ou) d'eau oxygénée ne suffit pas à expliquer l'activité inhibitrice rencontrée. Aussi a-t-il été suggéré la production d'autres substances antibactériennes. A partir d'une souche de *Str. diacetylactis* et d'une souche de *Ln. citrovorum* une purification d'un peptide a été réalisée, il s'agit d'un peptide de bas poids moléculaire différant par son spectre antibactériens, son poids moléculaire et sa localisation extracellulaire, des autres peptides antibactériens connus, produits par les bactéries lactiques telle la nisine, la diplococcine ou l'acidophiline (Devoyod et Poullain, 1988).

La compétition pour les nutriments joue un rôle important dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus*, ce dernier est un très mauvais compétiteur. En effet, il a été rapporté

---

que les bactéries lactiques pouvaient inhiber certains agents pathogènes par compétitions nutritionnelles (Rousseau, 2004 ; Charlier *et al*, 2008).

**Zadi *et al* en 2012** ont identifié et caractérisé 18 souches de *Leuconostoc* isolées à partir de lait de chamelle provenant de Béchar (Sud-Ouest Algérien), comme objectif de sélectionner des souches à potentialités technologiques utiles à l'industrie laitière. Ils ont constaté que les 18 souches de bactéries lactiques ont été identifiées à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. Les souches ne produisent pas de diacétyl, ni de lipases. Elles expriment une caséinolyse pouvant conduire à des peptides aromatiques. Elles sont en majorité moyennement acidifiantes et résistent à la majorité des antibiotiques.

## Conclusion

Cette étude a été consacrée en premier lieu à l'étude de l'influence de trois types de lait (lait de vache de chèvre et lait écrémé) sur le pouvoir acidifiant et l'activité anti-*Staphylococcus aureus* de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides*.

Au préalable, des analyses microbiologiques et physico-chimiques des échantillons des trois types de lait ont été réalisées. Les résultats obtenus pour les analyses microbiologiques sont non satisfaisants, et cela est dû probablement aux mauvaises conditions d'hygiène et non respect des bonnes pratiques de traite. Néanmoins, les analyse physico-chimiques ont révélé des taux supérieur à ceux exigé par les normes.

L'étude de l'effet antibactérien des trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* (ln 37, ln 25, et ln AL<sub>3</sub> à l'égard de *S. aureus* a été effectuée par le test des spots. Il ressort que *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* est la souche qui a témoigné une meilleure antibiose envers *S. aureus* (A) avec un diamètre de zone d'inhibition de 50 mm, cette dernière (souche ln 37) a été alors sélectionnée pour la suite de l'étude.

Afin de déterminer l'impact des différents types de lait sur la croissance et le pouvoir acidifiant de la souche *Ln. mesenteroides ssp* (ln.37) et de la souche cible *S. aureus* en culture pure, la mesure du pH et de l'acidité Dornic ainsi le suivi de la cinétique de croissance de ces dernières a été réalisée toutes les 2 heures pendant 6 heures et à 24 heures. Les résultats obtenus ont montré que la croissance de la souche *S. aureus* est meilleure dans le lait de chèvre ( $1,32 \cdot 10^{13}$  UFC/ml) que dans le lait de vache ( $6,07 \cdot 10^{11}$  UFC/ml) ou le lait écrémé ( $1,6 \cdot 10^{11}$  UFC/ml). La même observation est notée pour la souche ln 37, où le taux de croissance est de l'ordre de :  $1,37 \cdot 10^{11}$  UFC/ml,  $7,1 \cdot 10^{10}$  UFC/ml et  $7 \cdot 10^9$  UFC/ml pour les laits, de chèvre, de vache et écrémé respectivement.

Cependant aucune différence significative n'a été notée pour le pouvoir acidifiant dans les trois types de lait (les pH des milieux laits varient entre 4,2 à 4,9 après 24heures d'incubation).

L'effet antagoniste à été également étudié dans les trois types de lait en présence de  $10^6$  UFC/ml de *S. aureus* (A) et  $10^8$  UFC/ml de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides*, avec un suivi de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic dans la culture mixte. Au terme de cette

étude, un meilleur effet inhibiteur de la souche *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* avec une diminution de quatre unités logarithmiques des nombres de *S. aureus* a été observé dans le lait de chèvre comparé aux autres types de lait. Néanmoins aucune différence significative n'a été enregistrée.

Les résultats de cette étude montrent un bon pouvoir acidifiant dans les trois types de lait qui est un caractère technologique indispensable pour un ferment. L'effet antibactérien important de *Leuconostoc mesenteroides* obtenu vis-à-vis de *S. aureus*, incriminé dans les toxi-infections d'origine alimentaire précisément à partir des produits laitiers à base de lait cru, peut suggérer l'utilisation de cette dernière comme bioconservateur.

## Annexe I : Composition des milieux de cultures

### Bouillon MRS (Man, Rosa, Sharpe)

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1ml
Hydrogenophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0.2
Sulfate de manganèse	0.05

pH = 6.2

Autoclave à 120°C/20min

### Gélose MRS (Man, Rosa, Sharpe)

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1ml
Hydrogenophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0.2
Sulfate de manganèse	0.05
Agar	10

pH = 6.2

Autoclave à 120°C/20min

### Gélose nutritive

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

pH = 7.2

Autoclave à 120°C/20min

**Eau physiologique**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
NaCl	9

pH = 7.2

Autoclave à 120°C/20min

**Bouillon nutritive**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Extrait de viande	3
Pepton de viande	5

pH = 7.5

Autoclave à 120°C/20min

**Chapman**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Extrait de viande	1
NaCl	75
Peptone	10
Agar	15
Mannitol	10
Rouge de phénol	0.025

pH = 7.5

Autoclave à 120°C/20min

**Milieu Roth**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	20
Glucose	5
Azid	0,2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de potassium	2,7
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7

pH=6,8

Autoclave à 120°C/20min

**Gélose PCA**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	20
Glucose	5
Azid	0,2
Chlorure de sodium	5
Hydrogénophosphate de potassium	2,7
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7

pH=7± 0,2

Autoclave 115°C/20min

**Milieu Sabouraud**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	10
Glucose massé	20
Agar –agar	15
Eau distillée (qsq)	1000ml
Vitamines et facteurs de croissance	

pH = 6.0

Autoclave à 121°C/20min

**Bouillon de Giolitti et Cantoni**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Pastone	10 20
Extrait de viande	5 10
Extrait de levure	5 10
Chlorure de lithium	5 10
Mannitol	20 40
Chlorure de sodium	5 10
Glycine	1,2 2,4
Pyruvate de sodium	3 6

pH = 7

Autoclave 115°C/20min



**Gélose lactosée au désoxycolate**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone pepsique de viande	10
- Lactose	10
- Désoxycholate de sodium	0.5
- Chlorure de sodium	5
- Citrate de sodium	2
- Rouge neutre	0.03
- Agar agar bactériologique	15

pH = 7

Autoclave 115°C/20min

**Gélose PCA**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Tryptone	5
Extrait autolytique de levure	2,1
Glucose	1
Agar	15

pH = 7,4 ± 0,2.

Autoclave 115°C/20min

**Gélose EMB**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	10
Lactose	10
Eosine	0,4
Hydrogenophosphate de potassium	2
Bleu de méthylène	0,0625
Agar	15

pH=6,8

Autoclave 115°C/20min

**Milieu Litsky**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	20
Glucose	5
azide	0,2
éthyl-violet	0,5
NaCl	5
Hydrogenophosphate de potassium	2,7
dihydrogénophosphate de potassium	2,7

pH=6,8

Autoclave 115°C/20min

**Milieu VRBG**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Extrait de levure	3
Peptone	7
Chlorure de sodium	5
Sels biliaires	1,5
Glucose	10
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002
Agar	12

pH =7,4 ± 0,2.

Autoclave 115°C/20min

**Milieu BCPL**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	5
Lactose	10
Extrait de viande	3
Pourpre de bromoc <sup>2</sup> résol	25
Agar	15

pH= 6,8

Autoclave 115°C/20min.

---

**Gélose SS**

<b>Composition</b>	<b>g/l</b>
Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer III	1
Sels biliaries	8,5
Vert brillant	0,33
Rouge neutre	25
Thiosulfate de potassium	8,5
Agar	12

pH=7,3

Autoclave 115°C/20min

## Annexe II : Tableaux

**Tableau I** : Composition comparée des laits de vache et de chèvre (Brugère, 2003)

Composants chimiques	Lait de vache (g/l)	Lait de chèvre (g/l)
Eau	900	900
Matière protéique	32	30,8
Matière grasse	40,4	34,4
Lactose	48	48
Calcium	1,25	1,25
Phosphore	0,95	0,95
Caséine	27	18-26
Extrait sec total	125-130	116-134
Divers : vitamines, enzymes, gaz dissous	Traces	

**Tableau II** : La composition moyenne du lait écrémé en poudre (Cassany, 2010).

Composants	Poudre de lait écrémé (g/100g)
- Eau	4,1
- Glucides	50,8
- Protéines	35,7
- Protéines brutes	35
- Lipides	0,37
- Acides gras	0,347
- Cholestérols	0,016
- Vitamines	0,0154
- Minéraux	4,252
✓ Calcium	1,254
✓ Phosphore	1
✓ Iode	0,000085
✓ Zinc	0,004
✓ Magnésium	0,115

**Tableau III:** Les caractères spécifiques de lait en poudre écrémé destiné à la consommation humain (Lubin et FAO. 1998)

<b>Indice WPNI minimum</b>	<b>4 mg/g</b>
Humidité maximum	4mg/g
Indice WPNI minimum	4 mg/g
Matière grasse maximum	1,25 %
Acidité titrable maximum (méthode ADMI)	0,10 à 0,15 %
Solubilité maximum (ADMI)	1,25 ml
Impureté (particule brûlées) (ADMI)	Disque B ou mieux
Germes aérobies mésophile à 30°C maximum dans 1g	10 000
Bactéries coliformes maximum dans 0.1g	Absence
Levures et moisissures maximum dans 1g	50
Absence d'odeur et de goût désagréable ou anormaux	-
Matières grasses. On utilise généralement de la matière grasse laitière anhydre (MGLA). Elle doit répondre à la composition ci-après :	
Matière grasse minimum	99,8%
Humidité maximum	0,1 %
Acides gras libres maximum (en acide oléique)	0,3 %
Cuivre maximum	0,05 ppm
Fer maximum	0,2 ppm
Indice de peroxyde maximum	0,2
Neutralisants	Absence
Bactéries coliformes dans 1 g	Absence
Odeur et goût (à 20-25 °C)	Doux et francs, sans anomalies

Tableau IV: Les bactéries lactiques (Bouix et Leveau, 1993 ; Dilmi Bouras, 1991)

Genre		Type fermentaire	Molécules synthétisé à partir des glucides	Types de regroupements	catalase
Les coques lactiques	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	Cellules en paires ou en chaînettes	-
	<i>Leuconostoc</i>	Homofermentaire	Lactate, CO <sub>2</sub> et acétate (1 :1 :1)	Cellules en paires ou en chaînettes	-
	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>	Homofermentaire	Lactate	Cellules en paires ou en tétrade	+/-
Les bacilles lactiques	<i>Thermobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate	Cellule longues droites souvent en palissades	-
	<i>Streptobacterium</i>	Homofermentaire	Lactate	Cellules courtes souvent arrangées en filaments	-
		Hétérofermentaire	Lactate et acétate (1 :1)		
<i>Betabacterium</i>	Hétérofermentaire	Lactate, CO <sub>2</sub> et acétate (1 :1 :1)	Cellules courtes, droites et séparées	-	

**Tableau V : Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Leuconostoc* (Bouix et Leveau, 1993).**

	<i>Ln mesenteroides</i> subsp.			<i>Ln</i>	<i>Ln lactis</i>	<i>Ln oenos</i>
	<i>mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	<i>cremoris</i>	<i>parmesenteroides</i>		
<b>GC</b>	37-41	37-40	38-40	37-38	43-45	37-39
<b>Types de peptidoglycane</b>	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)  L-Lys-L-Ala-L-Ala	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)  L-Lys-L-Ala-L-Ala	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)  L-Lys-L-Ala-L-Ala	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)  L-Lys-L-Ala-L-Ala	(L-Lys-L-Ser-L-Ala-L-Ala)  L-Lys-L-Ser-L-Ser
<b>Croissance à 37°C</b>	+/-	+	-	+/-	+	+/-
<b>Croissance en présence de NaCl 3%</b>	+	+/-	-	+/-	+/-	ND
<b>Fermentation :</b>						
<b>Arabinose</b>	+/-	+/-	-	+/-	-	ND
<b>Cellobiose</b>	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-
<b>Fructose</b>	+	+	-	+	+	+
<b>Lactose</b>	+/-	+	+	+/-	+	-
<b>Lactose</b>	+	+	-	+	+	-
<b>Saccharose</b>	+	+	-	+	-	+
<b>Tréhalose</b>	+	+	-	+	-	+
<b>Hydrolyse de l'esculine</b>	+/-	+/-	-	+/-	-	+
<b>Utilisation de citrate</b>	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-
<b>Synthèse de dextrans</b>	+	+	-	-	-	-

**Tableau VI** : Exemples de bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des aliments (Drouault et Corthier, 2000).

Produits	Ingrédients	Bactéries lactiques
<b>Produits laitiers</b>		
Fromages	Lait de vache, chèvre ou brebis	Lactocoques, lactobacilles....
Yaourt	Lait de vache	<i>S.salivarius ssp thermophilus</i> et <i>Lbdelbruckii ssp Bulgaricus</i>
Laits fermentés	Lait de vache	<i>Lb acidophilus</i>
Kéfir	Lait de vache, de jument ou de chèvre	<i>Lb kefir</i>
<b>Produits carnés et de la pêche</b>		
Saucisses sèches	Porc, bœuf	Pediocoques, <i>Lb plantarum</i> , <i>Lb brevis</i>
Saucisses semi-sèche	Porc	Pediocoques
Izushi	Poisson, riz, légumes	<i>Ln mesenteroides</i> , <i>Lb plantarum</i>
<b>Produits végétaux</b>		
Ogi (Nigeria)	Maïs	<i>Lb plantarum</i> , <i>L lactis</i>
Olives	Olives vertes	Pediocoques, <i>Lb plantarum</i> , <i>Lb brevis</i> , <i>Ln mesenteroides</i>
Pickles	Concombres	
Choucroute	Chou	Pediocoques, <i>Lb plantarum</i> <i>Ln mesenteroides</i> ,
Sauce soja	Soja	<i>Lbplantarum</i>
Vin	Raisin	<i>Lb delbrueckii ssp bulgaricus</i>
Sake	Riz	<i>Ln oenos</i>
<b>Pain</b>		
Idli		<i>Lb sake</i> , <i>lb homohiochi</i>
« San francisco sourdough »	Farines de riz et de haricots Farine de blé	<i>Ln mesenteroides</i> <i>Lb sanfrancisco</i>



## Annexes III

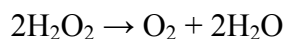
### I- Coloration de Gram :

Les étapes de la coloration de Gram sont les suivants :

- Près d'un bec bunsen : prélever un frottis (quelque colonie) des bactéries de la culture à l'aide d'une anse de platine et les étaler sur une lame en verre puis ajouter quelques gouttes d'eau distillée, ensuite flambé le dos de la lame au dessus de bec bunsen pour sécher la lame. Dans cette étape tout est stérile (fixé le frottis);
- Coloration par le violet de gentiane (1 à 2 gouttes) et laisser 30 Sec à 1min, puis rincer à l'eau distillée;
- ajouter 1 à 2 gouttes de Lugol et laisser agir 30 Sec à 1 min, puis rincer à l'eau distillée;
- La décoloration se fait par l'ajout de quelques gouttes d'alcool et laisser 30Sec, puis rincer avec de l'eau distillé;
- Recoloration à la fuchsine, Verser quelques gouttes de la fuchsine et laisser agir 40 sec ;
- Rincer et égoutter la lame, ajouter une goutte d'huile à immersion ;
- Finalement, la lecture se fait par le microscope optique;
  - Si on voit une coloration rose, c'est le gram négatif.
  - Si on voit une coloration violette, c'est le gram positif.

(Veron, 2012)

### II- Test de catalase:



- Sur une lame de verre propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes ;
- à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ou une anse plastique, ajouter l'inoculum bactérien, observer immédiatement.
- Au contact d'une colonie isolée ou sur la pente d'une culture en gélose, déposer une goutte d'eau oxygénée ; observer immédiatement (Guillaume, 2004).

### Lecture :

Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase + / pas de bulles : catalase –

## Annexes IV : Résultats

**Tableau I :** Résultats de dénombrement de la culture pure de *Leuconostocs mesenteroides ssp mesenteroides* dans les différents types de lait

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
<b>0h</b>	$8,4 \cdot 10^7$	7,92	$6,9 \cdot 10^7$	7,83	$5,6 \cdot 10^7$	7,75
<b>2h</b>	$2,8 \cdot 10^8$	8,45	$2 \cdot 10^8$	8,3	$1,9 \cdot 10^7$	8,28
<b>4h</b>	$1,16 \cdot 10^9$	9,06	$9 \cdot 10^8$	8,95	$1 \cdot 10^9$	9
<b>6h</b>	$1,3 \cdot 10^9$	9,11	$2,5 \cdot 10^9$	9,39	$1,67 \cdot 10^{10}$	10,22
<b>24h</b>	$7 \cdot 10^9$	9,84	$1,37 \cdot 10^{11}$	11,13	$7,1 \cdot 10^{10}$	10,85

**Tableau II :** Résultats de dénombrement de la culture pure de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml
<b>0h</b>	$7,75 \cdot 10^7$	7,89	$1 \cdot 10^7$	7	$3,25 \cdot 10^7$	7,51
<b>2h</b>	$3,85 \cdot 10^8$	8,58	$6,68 \cdot 10^7$	7,82	$4,43 \cdot 10^7$	7,64
<b>4h</b>	$1,09 \cdot 10^9$	9,03	$1 \cdot 10^8$	8	$1,43 \cdot 10^8$	8,15
<b>6h</b>	$6,2 \cdot 10^9$	9,79	$3 \cdot 10^{10}$	10,47	$4,1 \cdot 10^9$	9,6
<b>24h</b>	$6,07 \cdot 10^{11}$	11,78	$13,2 \cdot 10^{12}$	13,12	$16 \cdot 10^{10}$	11,20

**Tableau III :** Résultats de dénombrement de *Staphylococcus aureus* en culture mixte dans les différents types de lait

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	UFC/ml	Log UFC/ml	UFC/ml	Log UFC/ml	Log UFC/ml	Log UFC/ml
0h	2,48 10 <sup>8</sup>	8,39	8 10 <sup>7</sup>	7,9	10 <sup>7</sup>	7
2h	2 10 <sup>8</sup>	8,3	13,1 10 <sup>7</sup>	8,12	6 10 <sup>7</sup>	7,78
4h	1 10 <sup>7</sup>	7	4 10 <sup>7</sup>	7,6	10 <sup>7</sup>	7
6h	2 10 <sup>6</sup>	6,3	10 <sup>5</sup>	5	8 10 <sup>6</sup>	6,9
24h	1 10 <sup>6</sup>	6	10 <sup>4</sup>	4	10 <sup>5</sup>	5

**Tableau IV :** Evolution du pH et d'acidité Dornic de *Leuconostocs mesenteroides ssp mesenteroides* de la culture pure dans les différents types de lait

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic
0h	6,45	19	6,3	23	6,1	26
2h	6,32	20	6,27	26	6,08	28
4h	6,27	28	6,27	31	5,86	32
6h	6,27	38	5,47	56	5,79	32
24h	4,28	86	4,51	74	5,3	68

**Tableau V :** Evolution du pH et d'acidité Dornic de la culture pure de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait.

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic
0h	6,44	28	5,98	28	5,98	26
2h	6,37	30	5,83	30	5,83	28
4h	5,91	34	5,52	36	5,52	44
6h	5,75	40	5,35	38	5,35	48
24h	4,98	48	4,51	40	4,45	52

**Tableau V** : Evolution du pH et d'acidité Dornic de la culture mixte de *Staphylococcus aureus* dans les différents types de lait.

L'heure	Lait de vache		Lait de chèvre		Lait écrémé	
	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic	pH	Acidité Dornic
<b>0h</b>	6,34	41	6,33	30	6,11	21
<b>2h</b>	6,31	42	6,29	32	6,03	26
<b>4h</b>	6,17	50	6,24	40	5,88	25
<b>6h</b>	6,08	53	6,17	47	5,67	31
<b>24h</b>	4,3	90	5,85	60	4,53	60

## Annexes V

### ❖ Signification des symboles utilisés

$X_i$  : Résultats obtenues.

$X_i$  : Total des résultats d'un traitement.

$X$  : Somme général d'un essai.

$P$  : Nombre total d'un traitement.

$\sum X^2_{ik}$  : Somme des carrés des résultats d'un traitement.

$T$  : Somme générale des carrés des résultats d'un essai

### ❖ Les calculs

$SCE_i$  (Somme des Carrés des Ecart) =  $\sum X^2_{ik} - X^2_i / n_i$

$SCE_r$  (Somme des Carrés des Ecart résiduels) =  $\sum SCE_i$

$C$  (termes correctif) =  $X^2 / N$

$SCE_t$  (Somme des Carrés des Ecart) =  $T - C$

$SCE_f$  (Somme des Carrés des Ecart résiduels) =  $SCE_t - SCE_f$

### ❖ Calcul des degrés de liberté

$DDL_f$  (factoriel) =  $p - 1$ .

$DDL_r$  (résiduel) =  $n - p$ .

$CM$  (Carrés Moyens)

$CM_f$  (Carrés Moyens factoriels) =  $SCE_f / DDL_f$

$CM_r$  (Carrés Moyens résiduels) =  $SCE_r / DDL_r$

### ❖ Calcule de la valeur F

$F_c$  (F calculée) =  $CM_f / CM_r$

La valeur de F théorique ( $F_{th}$ ) à deux degré de liberté ( $DDL_f$ ,  $DDL_r$ ) avec un seuil de signification de 5%, la différence entre les résultats n'est considérée comme significative que si la valeur de  $F_c$  est supérieure ou égale à celle de  $F_{th}$ .

**Tableaux I** : Analyse de la variance de nombre de log de *Leuconostoc mesenteroides* dans la culture pure

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	8,876	9,12	9,22
<b>La variance</b>	0,42	1,295	1,349
<b>Ecart type</b>	0,650	1,138	1,161

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	0,313	2	0,156	<b>0,122</b>	0,885	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	15,341	12	1,178			
<b>Totale</b>	15,654	14				

Fc : F calculé

Conclusion :  $F_c (0,122) < F_{th} (3,885)$ , donc la différence est non significative.

**Tableaux II** : Analyse de la variance du nombre du log du nombre de *S. aureus* dans la culture pure

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	9,414	9,282	8,2
<b>La variance</b>	1,780	5,02	1,966
<b>Ecart type</b>	1,334	2,241	1,402

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	0,792	2	0,486	<b>0,133</b>	0,786	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	43,865	12	3,655			
<b>Totale</b>	44,839	14				

Fc : F calculé

Conclusion :  $F_c (0,133) < F_{th} (3,885)$ , donc la différence est non significative.

**Tableaux III** : Analyse de la variance du nombre du log du nombre de *staphylococcus aureus* dans la culture mixte

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	7,198	6,524	6,726
<b>La variance</b>	1,229	3,572	1,067
<b>Ecart type</b>	0,991	1,690	0,924

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	1,187	2	0,593	<b>0,303</b>	0,743	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	23,477	12	1,956			
<b>Totale</b>	24,665	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (0,303) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

**Tableaux IV** : Analyse de la variance du pH dans la culture pure de *Leuconostoc mesenteroides*

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	5,918	0,491	5,426
<b>La variance</b>	0,675	0,491	0,287
<b>Ecart type</b>	0,822	0,701	0,536

Source de variance	Somme des carré	Dégré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	0,633	2	0,317	<b>0,553</b>	0,606	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	7,271	12	0,606			
<b>Totale</b>	7,904	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**0,553**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

Tableaux V: Analyse de la variance du pH dans la culture pure de *staphylococcus aureus*

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
Moyenne	5,89	5,768	5,438
La variance	0,276	0,073	0,265
Ecart type	0,525	0,270	0,514

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,546	2	0,273	<b>1,068</b>	0,374	3,885
A l'intérieur des groupes	3,07	12	0,255			
Totale	3,617	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**1,068**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

Tableaux VI : Analyse de la variance du pH de la culture mixte

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
Moyenne	5,84	6,176	5,644
La variance	0,601	0,029	0,332
Ecart type	0,775	0,171	0,576

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupe	0,724	2	0,3620	<b>0,901</b>	0,432	3,885
A l'intérieur des groupes	4,819	12	0,402			
Totale	5,553	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**0,901**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.



**Tableaux VII** : Analyse de la variance de l'acidité Dornic dans la culture pure de *Leuconostoc mesenteroides*

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	38,2	42	37,2
<b>La variance</b>	617,76	391,6	242,56
<b>Ecart type</b>	24,85	19,877	15,574

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	64,133	2	32,06	<b>0,061</b>	0,940	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	6259,6	12	521,633			
<b>Totale</b>	6323,73	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**0,061**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

**Tableaux VIII** : Analyse de la variance d'acidité Dornic dans la culture pure de *Staphylococcus aureus*

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	66	26,8	140,8
<b>La variance</b>	36	34,4	39,6
<b>Ecart type</b>	7,266	4,630	10,61

Source de variance	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	70,933	2	35,466	<b>0,455</b>	0,664	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	734,4	12	77,866			
<b>Totale</b>	1005,333	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**0,455**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

**Tableaux IX** : Analyse de la variance dans la culture mixte de *Staphylococcus aureus*

	Lait de vache	Lait de chèvre	Lait écrémé
<b>Moyenne</b>	55,2	41,8	33,2
<b>La variance</b>	323,76	199,36	232,16
<b>Ecart type</b>	17,993	10,925	15,23

Source de variance	Somme des carrés	Dégré de liberté	Moyenne carré	Fc	Probabilité	Valeur critique pour F
<b>Entre groupe</b>	1229,2	2	614,6	<b>2,184</b>	0,155	3,885
<b>A l'intérieur des groupes</b>	3376,4	12	281,36			
<b>Totale</b>	4605,6	14				

Fc : F calculé

Conclusion : Fc (**2,184**) < Fth (3,885), donc la différence est non significative.

## Table des distributions F de Loi de Fisher F

$$P(F_{v_1, v_2} < f_{v_1, v_2, \alpha}) = \alpha$$

 $\alpha = 0,975$ 

$v_1$																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	*	
$v_2$	1	648	800	864	900	922	937	948	957	963	969	985	993	1001	1008	1013	1016	1017	1018	
	2	38,5	39,0	39,2	39,3	39,3	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,4	39,5	39,5	39,5	39,5	39,5	39,5
	3	17,4	16,0	15,4	15,1	14,9	14,7	14,6	14,5	14,5	14,4	14,3	14,2	14,1	14,0	14,0	13,9	13,9	13,9	13,9
	4	12,2	10,6	9,98	9,60	9,36	9,20	9,07	8,98	8,90	8,84	8,66	8,56	8,46	8,38	8,32	8,29	8,27	8,26	8,26
	5	10,0	8,43	7,76	7,39	7,15	6,98	6,85	6,76	6,68	6,62	6,43	6,33	6,23	6,14	6,08	6,05	6,03	6,02	6,02
	6	8,81	7,26	6,60	6,23	5,99	5,82	5,70	5,60	5,52	5,46	5,27	5,17	5,07	4,98	4,92	4,88	4,86	4,85	4,85
	7	8,07	6,54	5,89	5,52	5,29	5,12	4,99	4,90	4,82	4,76	4,57	4,47	4,36	4,28	4,21	4,18	4,16	4,14	4,14
	8	7,57	6,06	5,42	5,05	4,82	4,65	4,53	4,43	4,36	4,30	4,10	4,00	3,89	3,81	3,74	3,70	3,68	3,67	3,67
	9	7,21	5,71	5,08	4,72	4,48	4,32	4,20	4,10	4,03	3,96	3,77	3,67	3,56	3,47	3,40	3,37	3,35	3,33	3,33
	10	6,94	5,46	4,83	4,47	4,24	4,07	3,95	3,85	3,78	3,72	3,52	3,42	3,31	3,22	3,15	3,12	3,09	3,08	3,08
	11	6,72	5,26	4,63	4,28	4,04	3,88	3,76	3,66	3,59	3,53	3,33	3,23	3,12	3,03	2,96	2,92	2,90	2,88	2,88
	12	6,55	5,10	4,47	4,12	3,89	3,73	3,61	3,51	3,44	3,37	3,18	3,07	2,96	2,87	2,80	2,76	2,74	2,72	2,72
	13	6,41	4,97	4,35	4,00	3,77	3,60	3,48	3,39	3,31	3,25	3,05	2,95	2,84	2,74	2,67	2,63	2,61	2,60	2,60
	14	6,30	4,86	4,24	3,89	3,66	3,50	3,38	3,29	3,21	3,15	2,95	2,84	2,73	2,64	2,56	2,53	2,50	2,49	2,49
	15	6,20	4,76	4,15	3,80	3,58	3,41	3,29	3,20	3,12	3,06	2,86	2,76	2,64	2,55	2,47	2,44	2,41	2,40	2,40
	16	6,12	4,69	4,08	3,73	3,50	3,34	3,22	3,12	3,05	2,99	2,79	2,68	2,57	2,47	2,40	2,36	2,33	2,32	2,32
	17	6,04	4,62	4,01	3,66	3,44	3,28	3,16	3,06	2,98	2,92	2,72	2,62	2,50	2,41	2,33	2,29	2,26	2,25	2,25
	18	5,98	4,56	3,95	3,61	3,38	3,22	3,10	3,01	2,93	2,87	2,67	2,56	2,44	2,35	2,27	2,23	2,20	2,19	2,19
	19	5,92	4,51	3,90	3,56	3,33	3,17	3,05	2,96	2,88	2,82	2,62	2,51	2,39	2,30	2,22	2,18	2,15	2,13	2,13
	20	5,87	4,46	3,86	3,51	3,29	3,13	3,01	2,91	2,84	2,77	2,57	2,46	2,35	2,25	2,17	2,13	2,10	2,09	2,09

## Loi de Fisher F (suite)

$$P(F_{v_1, v_2} < f_{v_1, v_2, \alpha}) = \alpha$$

 $\alpha = 0,95$ 

$v_1$																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	50	100	200	500	*	
$v_2$	1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	246	248	250	252	253	254	254	254	
	2	18,5	19,0	19,2	19,2	19,3	19,3	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
	3	10,1	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,70	8,66	8,62	8,58	8,55	8,54	8,53	8,53	8,53
	4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,86	5,80	5,75	5,70	5,66	5,65	5,64	5,63	5,63
	5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,62	4,56	4,50	4,44	4,41	4,39	4,37	4,37	4,37
	6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	3,94	3,87	3,81	3,75	3,71	3,69	3,68	3,67	3,67
	7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,51	3,44	3,38	3,32	3,27	3,25	3,24	3,23	3,23
	8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,22	3,15	3,08	3,02	2,97	2,95	2,94	2,93	2,93
	9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,01	2,94	2,86	2,80	2,76	2,73	2,72	2,71	2,71
	10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,85	2,77	2,70	2,64	2,59	2,56	2,55	2,54	2,54
	11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,72	2,65	2,57	2,51	2,46	2,43	2,42	2,40	2,40
	12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,62	2,54	2,47	2,40	2,35	2,32	2,31	2,30	2,30
	13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,53	2,46	2,38	2,31	2,26	2,23	2,22	2,21	2,21
	14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,46	2,39	2,31	2,24	2,19	2,16	2,14	2,13	2,13
	15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,40	2,33	2,25	2,18	2,12	2,10	2,08	2,07	2,07
	16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,35	2,28	2,19	2,12	2,07	2,04	2,02	2,01	2,01
	17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,31	2,23	2,15	2,08	2,02	1,99	1,97	1,96	1,96
	18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,27	2,19	2,11	2,04	1,98	1,95	1,93	1,92	1,92
	19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,23	2,16	2,07	2,00	1,94	1,91	1,89	1,88	1,88
	20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,20	2,12	2,04	1,97	1,91	1,88	1,86	1,84	1,84

## Annexes VI : Table de Mac Grady

<i>2 tubes par dilution</i>		<i>3 tubes par dilution</i>					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
<b>000</b>	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
<b>001</b>	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
<b>010</b>	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
<b>011</b>	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
<b>020</b>	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
<b>100</b>	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
<b>101</b>	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
<b>110</b>	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
<b>111</b>	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
<b>120</b>	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
<b>121</b>	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
<b>200</b>	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
<b>201</b>	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
<b>210</b>	6.0	200	0.9	301	4.0		
<b>211</b>	13.0						
<b>212</b>	20.0						
<b>220</b>	25.0						
<b>221</b>	70.0						
<b>222</b>	110.0						

<b>5 tubes par dilution</b>							
<b>Nombre caractéristique</b>	<b>Nombre de cellules</b>	<b>Nombre caractéristique</b>	<b>Nombre de cellules</b>	<b>Nombre caractéristique</b>	<b>Nombre de cellules</b>	<b>Nombre caractéristique</b>	<b>Nombre de cellules</b>
<b>000</b>	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
<b>001</b>	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
<b>002</b>	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
<b>010</b>	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
<b>011</b>	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
<b>012</b>	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
<b>020</b>	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
<b>021</b>	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
<b>030</b>	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
<b>100</b>	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
<b>101</b>	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
<b>102</b>	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
<b>103</b>	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
<b>110</b>	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
<b>111</b>	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
<b>112</b>	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
<b>120</b>	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
<b>121</b>	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
<b>122</b>	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
<b>130</b>	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
<b>131</b>	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
<b>140</b>	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
<b>200</b>	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
<b>201</b>	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
<b>202</b>	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

# *Introduction*

*Conclusion*

*Partie*  
*bibliographique*



*Partie  
expérimentale*

*Résultats et  
Discussion*

# *Annexes*

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

**Aboutayeb R. (2011).** Technologie du lait et dérivés laitiers. [www.azaquar.com](http://www.azaquar.com) .

**Adiv et Ofival (2004).** Altérations microbiennes liées aux bactéries lactiques hétérofermentaire dans le jambon cuit supérieur. Viandes et produits carnés. 37p. site : <http://www.office-elevage.fr/vpc/11jsmtv/11JSMTV-H-POS4.pdf>

**Alais et Linden, 1987 :** Abrégé de biochimie alimentaire ED Masson, Paris. **Alais, 1984 :** Science du lait : principe des techniques laitières. Éd. Sep. Paris

**Ammor S, Tauveron, G, Dufour E et Chevallier I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17. P. 454–461.

**Aslim B, yuksekdag Z A, et Beyatli Y. (2006).** Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. Int J Food Sci Tech, 41. P. 973-979.

**Axelsson, L. (2004).** Lactic Acid Bacteria. Classification and Physiology. In: Salminen, S., von Wright, A and Ouwehand, A (Eds). Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Revised and Expanded. New York: Ed Marcel Dekker Inc.

### B

**Baharak Z. (1999),** Effet de la température sur la croissance bactérienne et la production de composés d'arôme dans du lait supplémenté de citrate par des bactéries lactiques mésophiles aromatisantes en culture mixte. Thèse en vue de l'obtention de la Maîtrise en Sciences Nutrition-Alimentation (m. Sc.). Université de Moncton.89.p

**Bouix M et Leveau J-Y. (1993).** Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industrielle, Collection Science et Technique Agroalimentaire. Paris, France. 611p.

**Bourgois C M, Mescle J et Zucca J. (1996).** Caractérisation microbiologiques des microorganismes, In microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 672p.

**Brugère H. (2003).** Cours sur Le lait et les produits laitiers. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

**Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, de Buyser M-L, Collette C, Garin-Bastuji B et Thorl M-F. (1997).** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 16 (1). p. 452-471.

### C

**Cassany G. (2010).** Lait en poudre, écrémé. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire. Table de composition nutritionnelle des aliments. <http://www.composition-des-aliments.fr/analyse-france/lait-poudre-ecreme>.

**Caplice E et Fitzgerald G F. (1999).** Food Fermentation: Rôle of microorganismes in food production and preservation .International Journal of of Food Microbiology. 50. p. 131-149.

**Charlier C, Cretenet M, Even S et Loir Y. (2009).** Interactions between *staphylococcus aureus* and *lactic acid bacteria*: An oldstory with new perspectives. International Journal of of Food Microbiology. 131. p. 30 - 39.

**Chomakov H V et Krov H. (1975).** Lactic acid bacteria in raw milk and white pickled cheese. Dairy Sci. Abstr. 37.134p.

**Courtet Leymarios F. (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration Par l'alimentation. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 112p.

**Cyrille Ngassam T. (2007).** Caractérisation de la flore lactique des laits fermentes artisanaux au senegal : Cas de la zone des niayes. Thèse de doctorat de vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de DAKAR Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar. France.106p.

**Daly M C, Duncan G, McDonough P et Williams D R. (1972).** Published correction appears in Am. J. Public Health, 29. p. 115-157.

**De Buyser M-L, Dufour B, Marie M et Lafarge V. (2001).** Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries International Journal of Food Microbiology. 67p.

**Décret du 25 mars 1924** portant application de la loi du 1er août 1905 en ce qui concerne le lait et les produits de la laiterie, version consolidée au 03 avril 1997, <http://www.legifrance.gouv.fr>, janvier 2010.

**Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Elui S et Courbois C. (1999).** L'élevage d'ici 2020 : la prochaine révolution alimentaire. Série alimentation, agriculture et environnement. 28. Italie, 86p.

**de Roissart H et Luquet F. (1994).** Bactérie lactiques 1. Ed. Lorcica, 1. 74p.

**Devoyod J J et Poullain F. (1988).** Les Leuconostocs propriétés: Leur rôle en technologie laitière. Le Lait, 68 (3). p249-280.

**Doleyres Y. (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotique par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de Doctorat, Université LAVAL, Faculté des Sciences de L'agriculture et de L'Alimentation. Québec. 148p.

**Dortu C et thonard P. (2009),** Les bactériocines de bactérie lactiques : Caractéristique et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agon. Soc. Environ. 13(1). P. 143 - 154.

**Dilmi Bouras A. (1991).** Assimilation du cholestérol par les bactéries lactiques. Physiologie, métabolisme, génomique et Application Industrielles. Edition 2010.page :1.

**Drider J et Prévast H. (2009).** Bactéries lactiques: Physiologie métabolisme, génomique et application industrielles. Paris. 539p.

**Drouault S et corthier G. (2000).** Effet des bactéries lactique ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Institut National de la Recherche Agronomique. Ves.Res. Ed Iorcia. France, 32. p. 131-149.

#### Ɛ

**El-Gendy S M, Abd-El-Galil H, Shahin Y et Hegazi F Z. (1983).** Characteristics of salt-tolerant lactic acid bacteria in particular *lactobacilli*, *Leuconostoc* and *pediococci* isolated from salted raw milk. 1. Food Prot, 46.p. 429-433.

#### Ƒ

**Fabres E. (2004).** Caractérisation de la dextrane-saccharase DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1229 et application à la synthèse de composés prébiotiques. Thèse de Doctorat Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries. Ecole Doctorale SEVAB de Toulouse, Filière microbiologie et catalyse industrielle. France. 259p.

**Fatet P. (2005).** Qualité du lait : Interprétation des comptages leucocytaires. Contrôle Laitier de l'Ain. Base documentaire Fidocl site : <http://www.fidocl.fr/content/interpretation-des-comptages-leucocytaires>.

**Faticentif Delana P, Farris G A et Soggia G. (1979).** Etudes microbiologiques sur le lait et le fromage de chèvre en Sardaigne. Lait, 59.p. 387-400.

**Faye B, Loiseau G. (2002).** Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Montpellier, France, 5p.

**Fédération Internationale de Laiterie. (1991).** The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. p.10-11. Site : <http://78.155.145.72/html/html1/IMG/pdf/Pathogenes-2.pdf>.

#### Ɠ

**Garrity G M et Holt J G. (2001).** Taxonomic outline of the Arichara Bacteriology. ED, II. Lastenholz. New York. p. 155-156.



**Groupe D'étude des Marches de REestoration Collective et de Nutrition (GEM RCN). (2009).** Lait et produits laitiers. Ccomité exécutif de l'OEAP. P.47.

**Guillaume, P.Y. (2004).** Les tests enzymatiques, antibiotiques et immunologiques. Site : [http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm)

**Guiraud J-P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. RIA (Le mensuel de l'innovation alimentaire). Paris, 651 p.

**Guy Leyral, Vernes-Bourdais E, Bonnefoy C et Guillet F. (2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Paris; Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 248p.

### *H*

**Haenlein G F W. (2004).** Goat milk in human nutrition. Small Rumin. 51. p.155- 163.

**Hajj seaman E, Did H, Abi Ramia et chehid M. (2011).** Caractérisation chimique et qualité bactériologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais. Lebanon. P. 21- 29.

**Hécharde Y, Renault O, Cenatiempo Y, Letellier F, Maftah A, Jayat C et Bressolier P. (1993).** Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines. Lait 73. p. 207-213.

**Hemme D et Foucaud-Scheunemann C. (2003).** *Leuconostoc*, characteristics, Use in dairy technology and prospects in functional foods. Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, France. 494p.

### *J*

**Jacky L, Snoep M-R, Joost Teixeira de Mattos M, Onse M. (2004).** The silicon cell initiative. FEMS Microbiology Letter. 116.p. 263-268

**Joyce K, Barrett T J, Teixeira L M et Facklam R R. (2004).** *Vagococcus carniphilus* sp. Nov., isolated from ground beef. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 54. p. 1505-1510.

## κ

**Kebchaoui J. (2012).** Le lait : Composition et propriétés. Faculté Polydisciplinaire de Taroudant (Maroc) et L'Enil de Besancon Mamirolle (France).37p. Site : <http://www.fpt.ac.ma/1.pdf>

**Kihal M. (2004).** Etude de la production de dioxyde de carbone pour *Leuconostoc mesenteroides* des éléments d'application en technologie fromagère type fromage bleu. Doctorat Science Biologique. Université de Bourgogne, Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'alimentation. Dijon, France, Université d'Oran, Algérie. 168p.

**Klein G, Pack A, Bonaparte I et Reteur G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic. Acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 41, p. 103-125.

**Krockel L, Schillinger U, Franz C M A P, Bantleon A et Ludwig W. (2003).** *Lactobacillus versmoldensis* sp. Nov, isolated from raw fermented sausage. International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology. 53. p. 513-517.

## £

**Laithier C. (2011).** Microflore du lait cru, vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens de la flore de lait de chèvre. Industrie d'élevage. 131p.

**Larousse agricole. (2002).** Lait. Dictionnaire français. 331p

**Larpent J-P. (1997).** Microbiologie alimentaire : Technologie de laboratoire, Paris. 1073p.

**Le Mens P, Lefrileuxy, Tormo H et Vernozy-Round C. (1999),** Etude de la croissance de *Staphylococcus aureus* dans le lait et les fromages de chèvre au lait cru, Paris. Renc. Rech. Ruminants, 6. France. 302p.

**Lubin D et FAO. (1998).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Alimentation et Nutrition. 28. 92p.

## *M*

**Madi N, Sadoun D. (2011).** Effet antibactérien de bactéries lactiques envers *Staphylococcus aureus* multirésistant isolé de lait de vaches mammites. Congrès International de Nutrition. Algérie. 159p.

**Makhloufi k M. (2011).** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie spécialité Microbiologie, Université Pierre et Marie Curie, France. 200p.

**Mamadou N. (1991) :** Contribution à l'étude comparative de la qualité micro biologique des laits crus, laits caillés et laits en poudre commercialisés dans la région de Dakar. Thèse de médecine Vétérinaire.

**Marth E H et Hussong R. (1963).** Effect of skim milk cultured with different strains of *Leuconostoc citrovorum* on growth of some bacteria and yeasts. J Dairy Sci. 46. 1037p.

**Marth E H. (1962).** Aspects of starter culture metabolism. J. Dairy Sci. 5.1271p.

**Matamoros S. (2008),** Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leurs utilisations dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat de Biotechnologies Agroalimentaires, Sciences de l'Aliment spécialité : Microbiologie, Université de Nantes, Faculté des Sciences et Techniques. France. 402p.

**Matthias A E, Rudi F V. (2005).** Molecular taxonomy and genetic of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 16.p. 31-42.

**Maret R et Sozzi T. (1976).** Flore lactique de fromageries d'alpages Suisses. Lait. 56. p. 304-318.

**Mittaine J. (1961).** Les laits autres que le lait de vache. Food and Agriculture at Organization. p. 695-709.

**Ménard J L et Heuchel V. (1994).** Prévention de la contamination du lait de vache par *Staphylococcus aureus*. Institut de l'Élevage. Compte rendu de fin d'opération d'une Recherche Financée par le Ministère de la Recherche et de la Technologie. 32 p.

**Messens W et L De Vuyst. (2002).** Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs. Int. J. Food Microbiol. 72. p. 31-43.

**Moualek I. (2011).** Caractérisation du lait de chèvre collecté localement : Séparation chromatographique et contrôle électrophorétique des protéines. Mémoire de Magister : Science Biologie, Science Biochimie et Biotechnologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Faculté des Sciences Technologiques Et Agronomiques. Tizi Ouzou. 54p.

### N

**Nunez J A, Chavarri F J, et Nunez M. (1984).** Psychrotrophic bacterial flora of raw ewes'milk, with particular reference to gram-negative rods. J. Appl. Bacteriol. 57p.

**Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N C, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E et Celano G V. (2007).** Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Italy. Int J Food Microbiol. 115 (3). 206P.

**Novello. (2003).** TP de microbiologie : analyse de l'eau. P 4,6.

### O

**Ouadghiri M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben » et « jben » d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie spécialité Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V – Agdal, Faculté des Sciences. Rabat-Maroc. 132p.

### R

**Ratinaud M H, Julien R, Fleury Y et Delfour A. (1995).** Les bactériocines contre *Listeria* : Une nouvelle famille de protéines. Lait 73. p. 207-213.

**Rousseau V. (2004).** Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore virginale. Thèse de Doctorat en Sciences Ecologique, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries .Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. France.186p

*S*

**Säde E. (2011).** *Leuconostoc* spoilage of refrigerated, packaged foods. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Helsinki, Finland.57p.

**Schmidt R. (1999).** Traité des matériaux : Tome 7, Comportements des matériaux dans les milieux. 448p.

**Shewmakaker P L, Steigerwalt A G, Morey R E, Carvalho M D G C, Elliott J A, joyce K, Barrett T J, Teixeira L M et Facklam R R. (2004).** *Vagococcus carniphilus sp. nov.*, isolated from ground beef. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 54.p. 1505-1510.

**Sommellier et Heuchel. (1999).** Caractérisation microbiologique et aptitudes technologiques des laits ultra propres. Compte-rendu d'étude. Institut de l'Elevage.

*T*

**Tabet E. (2009).** Etude microbiologiques et physiologiques des laits caprins et technologie fromagère améliorée. Thèse de Doctorat, Université Deglistudi Di Sassari. 74P.

*V*

**Veron B. (2012).** Coloration de Gram. Site : <http://www.microbiologie-medicale.fr>

**Vignola C L. (2002).** Science et technologie du lait: transformation du lait. 600p.

*W*

**Wehrmüller K et Ryffel S. (2007).** Produits au lait de chèvre et alimentation. ALP actuel 2007, no 28. Fiche technique destinée à la pratique. 4p.

*Y*

**Yannek N. (2010).** Effet des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait de vache en régions Montagneuse. Mémoire de Magister En Agronomie, Alimentation Animale et

Produits Animaux. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Facultés des Sciences Technologique et des Sciences Agronomiques. 83p.

## Z

**Zadi-karam H, Kalbaza K et Karam N-E. (2011).** Identification et caractéristiques technologiques de 18 souches de *Leuconostoc* isolées de lait de chamelle de Béchar. Université d'Oran-Sénia, Algérie. Ruminants 18. P199.

**Zarour K, Benmechernene Z, Hadadji M, Boumediene M B B, Henni J et Kihal M. (2012).** Caractérisation microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostoc mesenteroides* isolées du lait cru de chèvre et de chamelle d'Algérie, Nature et Technologie. P. 39-47.

**Zeller B. (2005).** Le fromage de chèvre : Spécificités technologiques et économiques. Thèse de doctorat pour l'obtention du Grade de Docteur Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. Ecole Nationale Vétérinaire. 78p.

## Résumé

Dans cette étude, l'effet antagoniste de trois souches de *Leuconostoc mesenteroides* à l'égard de *Staphylococcus aureus* par le test de spot a montré que *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* (37) est la souche qui a témoigné une meilleure antibiose envers *S. aureus* comparée à la souche *Ln. mesenteroides ssp cremoris* (25). La souche (37) a été alors retenue pour l'étude du pouvoir acidifiant et antibactérien vis-à-vis de *S. aureus* dans trois types de laits (vache, chèvre et écrémé) récoltés dans la région de Bejaïa. La croissance de ces dernières (37 et *S. aureus*) en culture pure, est plus élevée dans le lait de chèvre que dans le lait de vache ou le lait écrémé. L'effet antagoniste de *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* envers *S. aureus* dans chaque type de lait, a montré un plus grand effet inhibiteur vis à vis de *S. aureus* dans le lait de chèvre comparé aux autres types de laits. L'étude de l'évolution du pH et de l'acidité Dornic dans la culture pure et mixte a révélé un bon pouvoir acidifiant dans le lait qui est un caractère technologique indispensable pour un ferment. L'effet antibactérien important obtenu vis-à-vis de *S. aureus* de la souche de *Leuconostoc* peut suggérer l'utilisation de cette dernière comme bioconservateur.

**Mots clés :** *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, lait de vache, lait de chèvre, lait écrémé, pouvoir acidifiant, effet antimicrobien.

## Abstract

In this study, the antagonistic effect of three strains of *Leuconostoc mesenteroides* towards *Staphylococcus aureus* by the spot test showed that *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* (37) is the strain that appeared the better antibiosis to *S. aureus* strain compared to *Ln. mesenteroides ssp cremoris* (25). The strain (37) was then retained for the study of acidifying and antibacterial with respect to *S. aureus* in three kinds of milk (cow, goat and skim) collected in the region of Bejaia. The growth of the later (37 and *S. aureus*) in pure culture, is higher in the goat's milk than the cow's milk or skim milk. The antagonistic effect of *Ln. mesenteroides ssp mesenteroides* to *S. aureus* in each milk, showed a greater inhibitory effect with respect to *S aureus* in goat's milk compared to other milks. The study of the evolution of pH and Dormic acidity in the pure and mixed culture showed a good acidifying power in the milk which is essential for technological ferment. The important antibacterial effect achieved with respect to *S. aureus* strain *Leuconostoc* may suggest the use of the latter as bioconservator.

**Keywords:** *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, cow's milk, goat's milk, skim milk, acidifying power, antimicrobial effect.