



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA

FACULTE DESSCIENCESDE LA NATUREET DELAVIE

Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Mémoire

Présenté Pour l'obtention du Diplôme de
Master académique

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie générale et Biologie moléculaire

Thème

*Evaluation et caractérisation physico-chimique
Et microbiologique de la qualité du lait cru et le diagnostic de
La brucellose bovine au niveau de la wilaya Khenchela*

Présenté par :

Menasri Chems

Jury de soutenance

Président :Bouazza L.M.C.BUniversitéAbbes Laghrou –Khenchela

Encadreur : Halassi I.M.A.AUniversitéAbbes Laghrou –Khenchela

Examineur:Yakhlef W.M.A.A UniversitéAbbes Laghrou –Khenchela

Promotion : 2015-2016

*Laboratoire où entreprise le travail : Laboratoire de l'unité de production de lait cru
Laiterie -Alawres- Wilaya de Batna.*

Sommaire

Résumés

page

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Partie I .Synthèse bibliographique

1.Généralités sur le lait.....

1.1.Définition du lait

1. 2.Composition du lait

1.3.Variation dans la composition du lait

1.4.Quelques caractéristiques du lait cru

2.Microbiologie du lait cru

2.1Flore originelle du lait cru

2.2.Flore de contamination de lait cru... ...13

3.Qualité organoleptique du lait13

4.Procédés de conservation14

5.La brucellose animales.....16

5.1.La brucellose bovin..16

5.2. Caractères bactériologiques 71

5.3.Le Diagnostic de la brucellose....18

Partie II. Matériel et méthodes

1. L'échantillonnage.... 22

1.1. prélèvement...22

2. Analyses physico-chimiques

2.1 l'acidité.22

2.2 la matière grasse .22

2.3 la densité...25

3. Analyses microbiologiques

3.1. Préparation des dilutions26

3.2. Recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophiles (F.T.A.M)26

3.3. Dénombrement des coliformes.27)

3.4. Recherche des staphylocoques 28

3.5. Recherche des streptocoques 28

3.6. Recherche des levures et moisissures 29

3.7. diagnostic de la brucellose31

Partie III. Résultats et discussion

1. Résultats des analyses physico-chimiques du lait cru

détermination de l'acidité33

Détermination de la densité 33

détermination de la teneur en matière grasse 34

2. Résultats des l'analyses microbiologiques

Conclusion 37

Références bibliographiques 38

Annexe 40

Introduction

La consommation du lait est ancrée dans les habitudes alimentaires depuis la préhistoire, aujourd'hui elle est en croissance notable soit en tant que produit commercialisé à l'état de lait frais ou transformés en produit dérivés (fromages, beurre, laits fermentés, crèmes glacéesetc) (**BRULE, 2004**). Sa demande augmente plus vite.

La **FAO** estime que la consommation de lait par habitant dans le monde en développement aura augmenté de 1,3% par an entre 1999 et 2030 (soit une augmentation de 50% en 30 ans), alors que la production aura augmenté de 2,5% par an, soit un doublement de la production au cours de toute la période (FAO, 2007)

ARRÊTÉ INTERMINISTÉRIEL du 25 janvier 1998 (JORA) En effet, ce produit irremplaçable pour les nourrissons, Est aussi vital pour les autres tranches d'âge, car il assure un apport important en nutriment de bases (protides, lipides et glucides) et en élément minéraux, notamment le calcium et les vitamines. C'est pour ces raisons qu'un effort consistant est déployé de part le monde pour satisfaire ces besoins est répondre aux exigences de plus en plus affinées des consommateurs. (**POUGHEON, 2001**).

Notre pays n'échappe pas de cette problématique d'ensemble d'autant que la production laitière est insuffisante (environ 40% des besoins) d'où le recours à l'importation de grosses quantités de laits sous forme de poudre pour combler le déficit. **Araba A. (2006)**.

Comme tous les autres types d'aliments, le lait et les produits laitiers peuvent causer des maladies d'origine alimentaire. La qualité du lait peut être affectée par des facteurs tels que la contamination par des agents pathogènes et leur multiplication, les additifs chimiques, la pollution environnementale et la dégradation des nutriments. Les dangers microbiologiques constituent un problème majeur pour la sécurité alimentaire dans le secteur laitier, car le lait est un milieu idéal pour la croissance des bactéries et d'autres agents pathogènes. . Le lait peut contenir des micro-organismes nocifs tels que *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus*. **Auclair J. (1979)**.

Introduction

Notre travail a pour objectif l'étude de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait cru collecté dans la wilaya de kenchela. Il est structuré en chapitres comme suit :

- Le premier expose des généralités sur le lait.
- Le deuxième explique la méthodologie suivi ainsi que le matériel utilisé.
- Le troisième chapitre est consacré à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats obtenues.

Le lait

1. Définition du lait

Le lait est un liquide de couleur blanche, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races.

Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite ou de l'allaitement (**DERBY,2002**) (**MAZYOYER, 2007**).

Selon le congrès de Genève de 1910,

« Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir le colostrum.

Le lait cru est « produit par la sécrétion de la glande mammaire d'une ou de plusieurs vaches, et est non chauffé au-delà de 40 C° ni soumis à un traitement d'effet équivalent. » (**FIL,1991**).

2 . Anatomie du système sécrétoire du lait

Le pis d'une vache est un organe qui produit le lait et permet à un jeune veau de s'alimenter. Le pis est suspendu à l'extérieur de la cavité abdominale et il n'est donc pas supporté ou protégé par les structures du squelette.

Le pis de la vache composé de quatre glandes mammaires ou « quartiers ». Chaque quartier est une unité fonctionnelle indépendante des autres qui délivre le lait à travers sa propre mamelle .Les composants principaux du pis et leur fonction sont décrits dans la figure 01 (**GOSTA,2000**).

2.1. Système sécréteur et canaux lactifères

Le pis est une glande exocrine. Le lait y est sécrété dans des cellules spécialisées (alvéolaires) et déversé dans des canaux qui fonctionnent comme les tributaires d'un fleuve(**MICHELet al.,2000**).

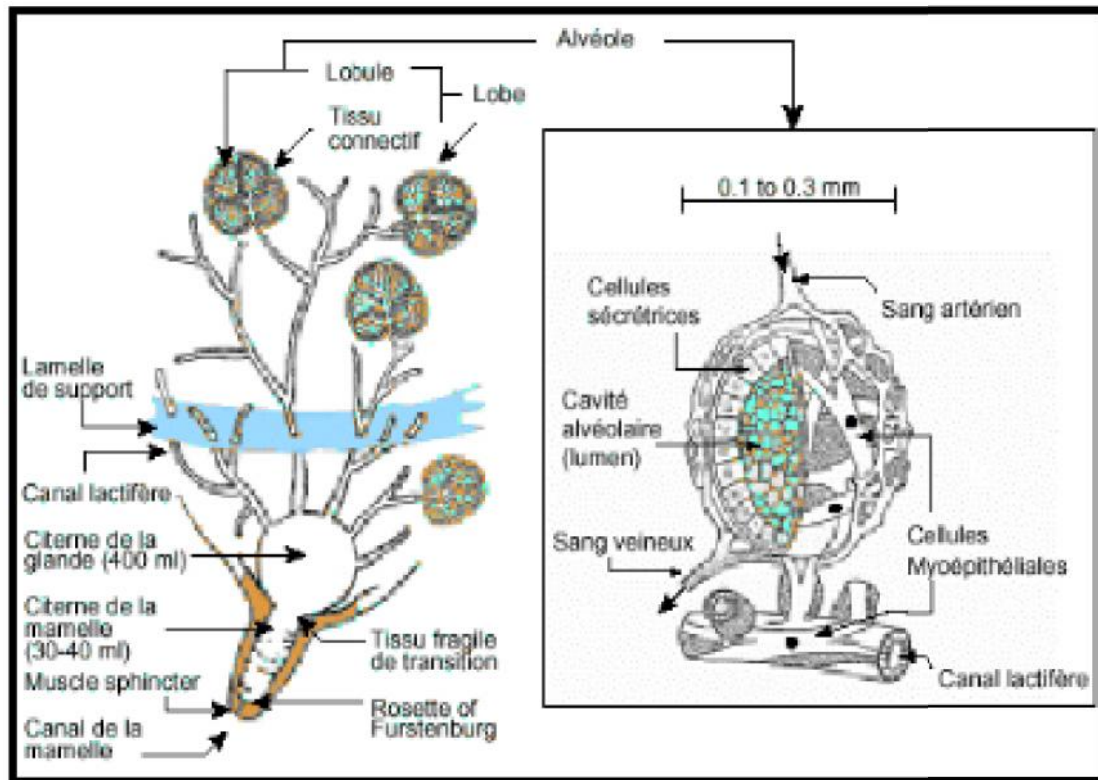


Figure 01 : le système sécrétoire du lait.

2.2. Système sanguin et structures capillaires

La production du lait demande beaucoup de nutriments qui sont apportées au pis par le flux sanguin. En plus, le sang y apporte les hormones qui contrôlent son développement (OLLIVIER, 1999).

2.3. Innervation du pis

Pendant la préparation du pis lors de la traite, ces terminaisons nerveuses sont stimulées et commencent une chaîne de réaction qui provoquent la « descente du lait » (libération du lait d'une cavité alvéolaire dans un canal lactifère) (MICHEL *et al.*, 2000). Le système nerveux et certaines hormones contrôlent le flux de sang vers le pis (OLLIVIER, 1999).

2.4. La traite

Une hormone, appelée oxytocine, doit être libérée dans le flux sanguin de la vache pour que le lait puisse descendre et le pis se vider. Cette hormone est sécrétée et stockée dans l'hypophyse. Lorsque la vache est prête pour la traite, grâce aux stimuli appropriés, un signal est envoyé à l'hypophyse, qui libère son stock d'oxytocine dans le flux sanguin. Chez la vache

Généralités sur le lait

primipare, le stimulus est fourni par le veau qui cherche à téter le trayon. L'oxytocine est libérée lorsque la vache sent le veau téter. Une vache laitière actuelle n'a pas de veau mais est conditionnée à réagir à d'autres stimuli, tels que des sons, des odeurs et des sensations associées à la (Clausen EM., Green BL et Litsky W. (1977).

3. La biosynthèse du lait de vache

La sécrétion lactée dans les cellules sécrétrices est un processus composé de multiples étapes biochimiques complexes. Une fois lancée en début de lactation, la sécrétion du lait n'arrête jamais complètement, sauf au tarissement. Entre les traites, le lait qui s'accumule dans le pis y augmente la pression et diminue la vitesse de synthèse (Burvenich, 2003).

3.1. Utilisation du glucose par les cellules sécrétrices

Le pis a besoin d'une grande quantité de glucose pour la synthèse du lait. Tout le glucose de la ration est fermenté en acides gras volatiles (acide acétique, propénoïque et butyrique) dans le rumen. Mais le foie utilise l'acide propénoïque pour synthétiser du glucose qui est transporté par le sang vers le pis ou il est utilisé par les cellules sécrétrices (DELBECCHI, 2001).

3.2. Synthèse du lactose

La synthèse du lactose est contrôlée par une paire d'enzymes (synthétase du lactose) la sous-unité a – lactalbumine de cette enzyme est une protéine qui se trouve dans le petit lait (DJONOVE, 2001).

3.3. Synthèse des protéines

Les caséines qui se trouvent dans le lait sont synthétisées à partir d'acides aminés prélevés du sang. Ces protéines sont assemblées en micelles avant d'être libérées dans la cavité alvéolaire. Le contrôle génétique de la synthèse du lait provient de la quantité d'a-lactalbumine synthétisées par les cellules sécrétrices. (BRADELY, 2002).

3.4. Synthèse de la matière grasse

L'acétate et le butyrate produit dans le rumen sont utilisés, en partie, pour la synthèse des acides gras qui constituent la matière grasse du lait (triglycérides) (AKERS, 2002).

Généralités sur le lait

Le glycérol nécessaire pour assembler trois acides gras en un triglycéride provient du glucose. La matière grasse du lait provient de l'acétate (17 à 45%) et du butyrate (8 à 25%) produits dans le rumen. La composition de la ration a une grande influence sur la concentration de matière grasse dans le lait. Le manque de fibre limite la synthèse d'acétate dans le rumen, ce qui conduit à la formation d'un lait pauvre en matière grasse (2 à 2,5 %). (GUIRAUD,2003).

4.Composition du lait

4.1..Eau

D'après (AMIOT & COLL, 2002), l'eau est le constituant le plus important du lait. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres dans l'eau lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides.

4.2. Matière grasse

JEANTET & COLL en (2008) rapportent que la matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0,1 à 10µm et est essentiellement constitué de triglycérides (98%). La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait.

Tableau 01: Distribution des principaux acides gras du lait de vache(%) (FAO, 1998)

Acide Gras	Moyenne	
Saturés	Butyrique	3.6
	Caproïque	2.3
	Caprylique	1.3
	Caprique	2.7
	Laurique	3.3
	Myristique	10.7
	Pentadéconoïque	1.2
	Palmitique	27.6

Généralités sur le lait

	Stéarique	10.1
	Arachidique	0.2
Monoinsaturés	Myristoléique	1.4
	Palmitoléique	2.6
	Oléique	26.0
Polyinsaturés	Linoléique	2.5
	Linoléinique	1.4
	Arachidonique	0.3
	Diène	0.8
	Polyénes	Traces

4.3 .protéines

Le métabolisme des acides aminés dans la glande mammaire est extrêmement complexe. Les acides aminés sont convertis en d'autres acides aminés ou ils sont oxydés pour produire de l'énergie. La majorité des acides aminés absorbés par la glande mammaire sont utilisés pour la synthèse des protéines du lait. (AGABRIEL,2001).

4-3-1.Caséine

La caséine est le nom de groupe de la classe dominante des protéines du lait. Les caséines forment facilement des polymères contenant des molécules de type identique ou différent. En raison de l'abondance des groupes ionisables et des parties hydrophobes et hydrophiles de la molécule caséique, les polymères moléculaires formés par les caséines sont très spéciaux. Ils sont constitués de milliers de molécules individuelles et forment une solution colloïdale, qui donne au lait écrémé sa teinte bleue blanchâtre.

Généralités sur le lait

4.4. Minéraux

Le lait contient des quantités importantes de différents minéraux. Les principaux minéraux sont calcium, magnésium, sodium et potassium pour les cations et le phosphate, chlorure et citrate pour les anions (tableau 02). (GAUCHIRONS, 2004)

Tableau 02 : composition minérale du lait de vache(JEANTET ET COLL, 2008)

Eléments minéraux	Concentration (mg/kg ⁻¹)
Calcium	1043-1283
Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	1323-2079
Sodium	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

4.5. Vitamines

Selon Viglona 2002, les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires (JEANTET ET COLL,2008)

Tableau 03: Concentration de minéraux et vitamines dans le lait (mg/100 ml) : (MICHEL et WATTIAUX, 2000)

Minérales	Concentration mg/100 ml	Vitamine	Concentration mg/ 100 ml
Potassium	38	Vitamine A	30.0
Calcium	125	Vitamine D	0.06
Chlore	103	Vitamine E	88.0
Phosphore	96	Vitamine K	17.0

Généralités sur le lait

Sodium	58	Vitamine B1	37.0
Soufre	30	Vitamine B2	180.0
Magnésium	12	Vitamine B6	46.0
Micro-minéraux	<0.1	Vitamine B12	0.42
		Vitamine C	1.7

4.6. Enzymes

(**POUGHEON, 2001**) définit les enzymes comme des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs. Une grande partie se retrouve dans membrane des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes.

Tableau 04 : composition du lait chez divers mammifères (**PETER GOUT, 2010**)

	Composition moyenne du lait en (g/l)							
	Eau	Extrait sec dont :	Matière grasse	Protéines			Glucide : lactose	Matières minérales
				Totales	caséine	Albumine		
Humaine (lait maternel)								
Femme	905	117	35	12-14	10-12	4-6	65-70	3
Equidés								
Jument	925	100	10-15	20-22	40-44	9-13	40-45	6-9
Anesse	925	100	10-15	20-22	40-44	9-13	40-45	6-9
Ruminantia, lait de vache								
Vache	900	130	35-40	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	120	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	5-8
Brebis	860	190	70-75	55-60	45-50	8-10	45-50	10-12
Bouffonne	850	180	70-75	45-50	35-40	8-10	45-50	8-10

Généralités sur le lait

Renne	675	330	160-200	100-105	80-85	18-20	25-50	15-20
Suidés								
Truie	350	185	65-65	55-60	25-30	25-30	50-55	12-15
Carnivores et lagomorphes								
Chienne	300	250	90-100	100-110	40-45	50-55	30-50	12-14
Chatte	350	200	40-45	90-100	30-35	60-70	40-50	10-13
Lapine	720	300	120-130	130-140	90-100	30-40	15-20	15-20
Cétacés								
Marsouins	430	600	450-460	120-130	.	.	10-15	6-8

5. Propriétés physico- chimiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité (**AMIOT et al.,2002**).

➤ Densité du lait

La densité du lait à 15°C et en moyenne de 1.032 (1.028-1.035). Elle est la résultante de la densité de chacun des constituants du lait (**MATHEIN, 1999**). Pour le lait entier, il convient de mesurer la densité à 30°C pour que les matières grasses soient à l'état liquide, car autrement, à l'état solide, les matières grasses ont une densité supérieure et variable. Retenons aussi que s'il y a présence d'air dans le lait, la densité sera plus faible (**POINTURIER,2003**).

➤ la teneur en matière grasse

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le dosage de la matière grasse, mais la technique acido-butyrométrique de GERBER (Méthodes de détermination du taux butyreux) reste la plus répandue car elle permet une mesure rapide et suffisamment précise. Cette méthode consiste en une attaque de lait par l'acide sulfurique et séparation, par centrifugation en présence d'alcool isoamylique et en utilisant des butyromètres gradués

➤ Acidité du lait

Généralités sur le lait

Selon JEANet *al* (1993), l'acidité du lait résulte de l'acidité naturelle, due à la caséine, aux groupes phosphate, au dioxyde de carbone et aux acides organiques et de l'acidité développée, due à l'acide lactique formé dans la fermentation lactique. L'acidité titrable du lait est déterminée par le dosage par une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine. Bien que l'acide lactique ne soit pas le seul acide présent, l'acidité titrable peut être exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lait ou en degré Dornic (°D décigramme). °D=0.1g d'acide lactique par litre de lait.

Un lait dont l'acidité est $> 27^{\circ}\text{D}$ coagule au chauffage ; un lait dont l'acidité est $> 70^{\circ}\text{D}$ coagule à froid. Le mouillage du lait provoque une diminution de son acidité qui se situe normalement entre 15 et 18 ° D pour un lait frais.

PH

Le pH du lait d'une espèce donnée varie selon le stade de lactation, il diminue vers la fin du cycle suite à l'augmentation du taux de caséines et de phosphates chez la chèvre. (Singh E, 1972). Pour le lait de la vache oscillent 6.6 et 7.5

Tableau 05 : Caractéristiques physico- chimiques du lait de vache.

(FAO ,1998)

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Energie (Kcal/litre)	701	587-876
Densité du lait entier, 20C°	1.031	1.028-1.033
PH à 20 C°	5.6	5.6-6.8
Acidité titrable(Dornic)	16	15-17
Point de congélation (C°)	1.6-2.1	0.52--0.55
Viscosité du lait à 20 C°	1.8	1.6-2.1
Point d'ébullition (C°)	-	100.71-100.15

6. La flore du lait

6.1. Bactéries

❖ Flore originelle

Généralités sur le lait

Le lait contient peu de micro-organisme lorsqu'il est prélevé dans les bonnes conditions à partir d'un animal sain (Moins de 103germe/ml).

Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux *galactophores* : microcoques mais aussi *streptocoques* lactiques (*lactococcus*) et les lactobacilles. Le lait est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « Lacténines » : mais leur action est de très courte durée (1heure environ)(**GUIRAUD, 2003**).

D'autres micro-organismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux du point sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infection du pis : *streptocoques* pyogènes, corynébactéries pyogènes, staphylocoque...etc .Il peut s'agir aussi de germe d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du le pis : salmonelle ; brucella ,agent de la fièvre de Malte et exceptionnelle (*Bacillus anthracis*) .agent du charbon et quelques virus exemple : *Encéphalite* ,Les germes banaux du pis ne présentent pas de danger sanitaire mais peuvent se développer abondamment dans le lait (Tableau 06) (**VEISSEURE, 1979**).

❖ Flore de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origine fécale ou des téguments de l'animale : les coliforme, les entérocoques et éventuellement les Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc. ou d'origine tellurique : bactéries sporulées, spores fongiques, *Streptomyces*, *Listeria*. Les litières et les aliments peuvent être des sources de contaminations par leur flore banale variée, en particulier : lactobacilles, *Clostridium butyriques* .Il peut être aussi contaminé par l'équipement de traite et de stockage du lait qui peuvent contenir des microcoques. (Tableau 04) (**Visseuse., 1979**).

Tableau 06 :Les principaux groupes bactériens du lait (**ALAIS, 1984**)

	Groupes	Caractères
	Bactéries lactiques	Activité biologique : fermentation du lactose
	Microcoques	Flore banale de contamination du lait « activité enzymatique réduite
	Staphylocoques	Anaérobies facultatifs ; fermentent de lactose exemple : <i>Staphylococcus aureus</i> Développement dans le lait à 15°C pendant

Généralités sur le lait

		plusieurs heures.
Bactéries « Gram + »	Bacillaceae.	Mésophiles, inhibées à 45°C, Absentes dans le lait cru et les produits laitiers qui n'ont pas été chauffés.
Bactéries « Gram - »	Entérobactéries	Des coliformes, fermentent le lactose. Leur présence est liée à une contamination fécale. Moins abondantes dans le lait par rapport à d'autres gram(-) Ces espèces résistent aux antibiotiques, se développent à des températures très différentes.
	Achromobactériaceae	Ces microorganismes forment l'essentiel de la flore psychotrope. Ne fermentent pas les sucres.
	Bactéries divers	Les plus importantes Pseudomonas véhiculées par les eaux non potables et brucella pathogènes.

❖ Champignons

Ils regroupent en réalité deux types de micro-organismes : les levures et les moisissures.

➤ Levures

Etant donné leur grande capacité d'adaptation à de nombreux substrats, les levures sont très largement répandues dans l'environnement et se retrouvent de façon normale dans le lait. Ce sont des champignons chez lesquels la forme unicellulaire est prédominante (ALAIS, 1984)

➤ Moisissures

Tout comme les levures, les moisissures peuvent être véhiculées par l'environnement et se retrouver dans le lait. Ce sont des micro-organismes filamenteux qui sont disséminés par l'émission de spores. Leur présence est de façon superficielle ou interne (BYLUND, 2005).

7. Qualité organoleptique du lait

VIERLING (2003) rapporte que l'aspect, l'odeur, la saveur, la texture ne peuvent être précisés qu'en comparaison avec un lait frais.

7.1. Couleur

Le lait est de couleur blanc mat, qui est due en grande partie à la matière grasse, aux pigments de carotène (la vache transforme le B-carotène en vitamine A qui passe directement dans le lait)(FREDOT, 2006).

7.2.L'odeur

Selon Vierling (2003). L'odeur caractéristique du lait est celle de la matière grasse qu'il contient est qui fixe des odeurs animales. Elle est liée à l'ambiance de la traite, l'alimentation (les fourrages à basse d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une forte odeur) et à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette).

7.3. La saveur

La saveur du lait normal frais est agréable. Celle du lait acidifié est fraîche et un peu piquante. Les laits chauffés (pasteurisés, bouillis ou stérilisés) ont un goût légèrement différent de celui du lait cru (REMUENT, 2009). Les laits de rétention et de mammites ont une saveur salée plus ou moins accentuée. (THIEULIN *et al.*, 1967).

7.4. Viscosité

Rheotest (2010) a montré que la viscosité du lait est une propriété complexe qui est particulièrement affectée par les particules colloïdes émulsifiées et dissoutes. La teneur en graisse et en caséine influence fortement la viscosité du lait. La viscosité est une caractéristique importante de la qualité du lait.

8. Procédés de conservation

Par le froid

Actuellement, le froid est un moyen très pratique de conserver les aliments. Tout en préservant leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques.

✓ Réfrigération

Généralités sur le lait

La réfrigération est une technique de semi conservation, et consiste à placer les denrées dans enceinte maintenu vers +5°C. Cette température inhibe les développements des germes mésophiles par contre le traitement est sans effet sur psychrophiles, qui se développent à la température de réfrigération.(**GOSTA, 1995**).

✓ **Congélation**

Est un procédé physique qui a pour but la conservation prolongée par le froid. Les produits alimentaires sont conservés à -20°C, il est très important que le lait destiné à être conserver par le froid soit de bonne qualité hygiénique. Le but d'emploi de froid est souvent d'inhiber, retarder ou arrêter d'une part les réactions enzymatiques dans le produit alimentaire et d'autre part la croissance des micro-organismes.

En résumé, le froid constitue un moyen important de conservation du lait. (**GOSTA, 1995**).

✓ **Par la chaleur**

Contrairement à l'action du froid. La chaleur permet de détruire les microbes et non d'inhiber simplement leur développement. D'autre part elle vise à détruire les enzymes qui peuvent impliquer la détérioration du lait. Ce qui permet l'amélioration de la qualité du lait.

✓ **La pasteurisation**

Est un processus de traitement thermique qui vise à détruire certains micro-organismes présentes dans produit, alors le processus de pasteurisation consiste à chauffer l'aliment jusqu'à une certaine température, souvent inférieur à 100°C, elle est employée pour les aliments qui nécessitent uniquement la destruction des germes pathogènes ou toxigènes(**VERLING, 2003**).

✓ **La stérilisation**

Elle vise à destruction totale des micro-organismes et des spores présents dans le produit. La stérilisation consiste à chauffer le produit alimentaire à 120°C pour lui assurer une conservation prolongée. Pour cette raison, le traitement de « stérilisation » vise, en pratique, d'obtenir un produit restant stable au cours d'une longue conservation (de 5 à 6 mois)(**VERLING, 2003**).

II- La brucellose animales

1. La brucellose bovine

La brucellose est une maladie infectieuse et contagieuse due à des bactéries du genre *Brucella*, d'évolution aiguë ou chronique, commune à de nombreuses espèces animales et à l'homme et affectant principalement les organes de la reproduction. La brucellose est une zoonose majeure à déclaration obligatoire et d'un vice rédhibitoire dans l'espèce bovine. Chez l'homme, elle est aussi dénommée « fièvre de malte » ou « fièvre ondulante » (MÉRIAL, 2004).

2. Caractères bactériologiques

2.1. Caractères morphologiques

Brucella est un très petit coccobacille à Gram négatif de 0,5-0,7 x 0,6-1,5 µm (7,5 µm pour un globule rouge). La bactérie est immobile, non encapsulée, non sporulée et aérobic stricte.



Figure 02. Aspect microscopique de *brucella*

Dumont J.P., Delespaul G., Miguot B. et Adda J. (1977).

1. Pathogénie

La pénétration de la bactérie se fait généralement via la muqueuse orale, du nasopharynx, des conjonctives, par voie génitale, et parfois par des lésions cutanées. Il se produit alors une réaction inflammatoire aiguë de la sous muqueuse avec infiltration de leucocytes (granulocytes neutrophiles et monocytes), puis il y a extension par voie lymphatique aux noeuds lymphatiques locaux. L'infection brucellique est une infection chronique qui évolue en deux périodes :

- Période primaire :

Suite à la contamination, il y a d'abord une multiplication des *Brucella* dans les noeuds lymphatiques drainant le site d'inoculation, où les bactéries peuvent persister pendant très longtemps. Ensuite, si les *Brucella* ne sont pas éliminées, il se produit une dissémination, par voie lymphatique et dans une moindre mesure par voie sanguine. L'animal présente alors une bactériémie qui peut mener à l'infection de nombreux tissus: tissus lymphoïdes (surtout les noeuds lymphatiques de la sphère génitale), placenta des femelles gravides, testicules et leurs annexes, glande mammaire, bourses séreuses et synoviales, et certaines articulations.

- Période secondaire

Elle est marquée par un état de résistance de l'hôte, grâce au développement d'une immunité, qui ne mène que rarement à la guérison. En effet, les *Brucella* peuvent survivre plusieurs années dans certains sites, comme dans les noeuds lymphatiques, demeurant à l'intérieur des cellules phagocytaires, à l'abri du complément et des anticorps. Leur réactivation est possible à chaque gestation, entraînant alors un avortement et/ou une excrétion de bacilles au cours de la mise bas. Lorsque des bactéries persistent au niveau des séreuses et des articulations, un hygroma ou une arthrite chronique peuvent se développer.

Edberg SC., Rice EW., Karlin RJ. et Allen MJ. (2000).

2. La transmission à l'homme

La transmission à l'homme se fait principalement par contact direct avec le bétail, en général par voie cutanéomuqueuse (peau saine ou lésée, conjonctive, tractus respiratoire) ou indirectement, dans 25 % des cas, par voie digestive : la contamination est alors liée aux habitudes alimentaires (lait cru, fromage frais, crème non pasteurisée).

Dumont J.P, Delespaul G., Miguot B. et Adda J. (1977).

3. Le Diagnostic de la brucellose

3.1. Diagnostic épidémiologique-clinique

Il est difficile à réaliser car les symptômes de la brucellose sont tardifs et peu spécifiques. En effet, après une longue période asymptomatique, la maladie est subclinique chez la plupart des animaux. Cependant, le recueil des commémoratifs du troupeau peut faciliter une suspicion. Le diagnostic de laboratoire est donc toujours nécessaire, par isolement de la bactérie ou mise en évidence d'anticorps dans le sérum.

Une suspicion de brucellose bovine peut être émise lors de : avortement isolé ou en série, mort d'un veau en anoxie dans les 48h après la mise bas, fréquence anormale des rétentions placentaires, hygromas, et orchite/épididymite chez le mâle

3.2. Diagnostic expérimental

Les **prélèvements** les plus souvent utilisés pour le diagnostic de laboratoire sont : des calottes placentaires, du liquide utérin, l'avorton lors d'un avortement, ou du sang. On utilise aussi parfois du colostrum, du sperme, des sécrétions vaginales, ou du tissu et des nœuds lymphatiques. Le dépistage est possible à partir de sang sur tube sec ou de lait de mélange récolté dans le tank.

3.2.1. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Il est réalisé par examen microscopique avec colorations, ou par culture en milieux sélectifs, permettant une identification de genre et espèce.

3.2.2. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Le diagnostic et le dépistage sérologiques est très utilisé, sur sérum ou lait. Les anticorps détectés sont ceux dirigés contre les épitopes du LPS (**lipopolysaccharide**) , ce qui entraîne des problèmes de parenté entre *Brucella abortus* et d'autres bactéries.

* **Epreuve à l'antigène tamponné (EAT) = Test Rose Bengale**

L'antigène utilisé est une suspension de *Brucella abortus* (souche 99 de Weybridge) inactivée par la chaleur et le phénol (0,5%), diluée en tampon acide puis colorée par le Rose Bengale. Il doit être conservé entre 2 et 8°C, à l'obscurité, et ne doit surtout pas être congelé. Selon les normes de l'Office International des Epizooties, l'antigène pour le test au Rose Bengale est préparé en récupérant par centrifugation des souches 99 de *Brucella abortus* stérilisées,

Généralités sur le lait

et en les remettant en suspension dans du phénol salin. Pour chaque 35 mL de cette suspension, on rajoute 1 mL de Rose Bengale à 1 % dans de l'eau distillée ; et le mélange est agité pendant deux heures à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et centrifugé pour recueillir les cellules colorées, remises en suspension au taux de 1g de cellules pour 7mL de diluant (hydroxyde sodique, phénol, acide lactique). La couleur de cette suspension doit être rose intense, et le surnageant doit être sans colorant. La suspension est de nouveau filtrée à plusieurs reprises, puis conservée à l'obscurité et au frais.

Ce test permet le diagnostic sérologique des brucelloses (*melitensis*, *suis*, *abortus*) sur lame, en milieu acide tamponné (pH 3,65 ±0,05). Le tampon acide permet d'augmenter la spécificité car l'activité agglutinante des immunoglobulines G augmente en pH acide (le Test d'Agglutination de plaque, présenté page 45, utilise également un antigène brucellique tamponné). C'est une des méthodes les plus faciles à mettre en oeuvre et la plus largement utilisée pour la mise en évidence des anticorps brucelliques dans les sérums.

L'antigène et le sérum à analyser sont mélangés à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinants visibles à l'œil nu. Si il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène. Le mode opératoire est le suivant :

- Placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C), 30 à 60 minutes avant le début du test
- Sur une plaque, déposer 30 µL de chacun des sérums à tester
- Agiter doucement le flacon d'antigène
- Déposer 30 µL d'antigène coloré à côté de chacun des sérums
- Mélanger soigneusement l'antigène et le sérum
- Agiter la plaque pendant quatre minutes exactement et lire immédiatement

Il est préférable d'avoir un témoin positif (sérum infecté) et un témoin négatif.

Pour l'interprétation, une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, tandis que l'existence d'une agglutination, aussi minime soit elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*.

Ce test est très sensible, en particulier chez les animaux vaccinés. En effet, le vaccin peut provoquer une forte réponse en anticorps, et interférer alors avec les tests sérologiques. Des faux négatifs peuvent apparaître, et seront détectés en renouvelant le test à au moins trois mois d'intervalle. Simple et rapide, ce test est donc surtout utilisé en dépistage. Une fixation du complément ou une ELISA sont ensuite nécessaires pour confirmer les positifs ou douteux.

Généralités sur le lait

Pour les petits ruminants, c'est le test le plus utilisé en dépistage, avec une sensibilité de 90 % et une détection des anticorps plus précoce que pour la fixation du complément. Cependant, la sensibilité de ce test peut beaucoup varier en fonction de la situation épidémiologique de la maladie.

* Epreuve de l'anneau sur le lait = Ring Test

C'est une réaction d'agglutination qualitative obtenue par interaction des anticorps contenus dans le lait dirigés contre le LPS bactérien avec un antigène coloré par l'hématoxyline. Les agglutinats colorés sont adsorbés sur les globules gras et se regroupent en surface dans l'anneau de crème.

* Séro-agglutination de Wright

C'est une technique d'agglutination lente en tubes. Des dilutions de sérum à titrer sont mises en présence de quantités constantes d'antigènes brucelliques, puis ces dilutions sont mises à incuber une nuit à 37°C.

Lorsque le sérum est positif, il se forme des complexes antigène/anticorps qui précipitent en formant un culot, tandis que le surnageant devient transparent. Lorsque le sérum est négatif, le mélange réactionnel reste opaque.

Ce test, moyennement sensible et très peu spécifique, n'est pas reconnu comme test de référence par les organismes internationaux.

* Fixation du Complément

Cette technique est très utilisée comme test de confirmation mais elle est compliquée à réaliser, demande un équipement de laboratoire sophistiqué et une équipe bien formée. La fixation du complément peut être réalisée à chaud (37°C pendant 30 minutes) ou à froid (4°C pendant 14-18 heures), avec des caractéristiques légèrement différentes, à adapter à la qualité des sérums testés..

* Epreuve de l'antigène BPA (Buffered Plate Agglutination)

C'est une méthode rapide et facile, utilisant un principe d'agglutination rapide sur lame en milieu acide tamponné (pH 3,7), ce qui permet d'éliminer les agglutinations non spécifiques. Les colorants utilisés sont le cristal violet et le vert brillant.

* ELISA (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay):

Pour la réalisation de ce test, le LPS de *Brucella* est fourni fixé sur les parois des puits des microplaques en polypropylène. Les sérums ou laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. Si il y a des anticorps spécifiques, il se forme alors des complexes LPS/anticorps fixés sur les parois du puits. Après lavage, une immunoglobuline anti-anticorps

Généralités sur le lait

couplée à une enzyme est mise à incuber, et ce conjugué se fixe sur l'immun complexe. Après un deuxième lavage, le substrat de l'enzyme (TMB) est ajouté dans les puits.

Si l'immun complexe est présent, l'enzyme assure la transformation du substrat en un composé bleu, devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps présents dans l'échantillon. Le seuil de positivité est fixé à partir d'un échantillon de contrôle positif à introduire sur chaque microplaque..

* Fluorescence Polarisation Assay

C'est une technique simple et rapide de mesure d'interaction antigène/anticorps, qui peut être pratiquée aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Elle est recommandée comme test de référence dans le cadre du commerce international. Le mécanisme de ce test est basé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille des molécules étant le principal facteur influençant le taux de rotation, qui y est inversement proportionnel, une petite molécule tourne plus vite qu'une grosse.

En conclusion, selon les recommandations de l'Office International des Epizooties, le test Rose Bengale, le BPAT (Buffered Plate Agglutination Test), l'ELISA et le test en lumière polarisée sont des bons tests de dépistage. Mais les positifs doivent toujours être confirmés en raison de leur manque de spécificité.

Euzeby J.P. (2003).

I. Analyses physico-chimiques

Trois échantillons de lait cru de vaches d'étables de trois fermes de la région de Khenchela (ElHamma, Fais, Remila) ont été analysés pour leurs paramètres physicochimiques et microbiologiques à raison de 2 prélèvements pour chaque échantillon. Ces dernières ont été effectuées au niveau de laboratoire de l'unité de production de « EL Awres ». La qualité physicochimique du lait a été évaluée par la réalisation des tests physico-chimiques (Matière grasses, acidité, densité).

Les résultats des essais et leur interprétation seront valables et significatifs si l'échantillon soumis est représentatif et que la stabilité du produit est assurée depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse. Nos échantillons de lait cru ont été collectés et sont directement transmis sans retard au laboratoire dans des conditions de température de 4 °C.

1.L'acidité

Selon (LUQUET, 1985). Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'acidité du lait :

- Le test de phénol phtaléine
- Mesure pH
- **1.1.Le teste de phénol phtaléine**

1.1.1. Principe

L'acidité est déterminée par le dosage de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium à 0,11 moles/l. La présence de phénolphtaléine, comme indicateur coloré sensible au pH, indique la limite de la neutralisation par changement de couleur (il est rose en milieu basique ou neutre, et devient violet au milieu acide). Cette acidité est exprimée en degré Dornic (°D) où : 1 ° D représente 0,1 g d'acide lactique dans un litre de lait.

Bonfoh B., Fané A., Traoré N. A, Coulibaly Z., Simbé C. F, Alfaroukh O., Nicolet J., Farah Z. et Zinsstag J. (2002).

Matériel et Méthodes

1.1.2. Mode opératoire

- 10 ml de l'échantillon sont préparés dans un bêcher de 100 ml.
- on ajoute à la solution 0,3 ml de la solution de phénolphtaléine à 1% ;
- on titre avec la soude (NaOH N/9) jusqu'au virage au rose de la solution qui doit persister pendant une dizaine de secondes. L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) et donnée par lecture directe du volume (ml) de soude versée.



Figure 03 : Mesure de l'acidité par test de Phénol phtaléine

1.2. Mesure de pH

1.2.1. Principe

La mesure de pH est réalisée à l'aide de pH mètre, cette méthode permet de déterminer l'acidité du milieu, tout en mesurant le pH et en indiquant la température de l'échantillon mesurée.

1.2.2. Mode opératoire

Introduire les électrodes de l'appareil à l'intérieur du flacon remplie de l'échantillon de lait, puis la lecture se fait immédiatement sur l'écran ou s'affichent : le pH, température et l'heure.



Figure04 : mesure du pH .

2.La matière grasse

Les dosages de la matière grasse doivent être commencés le plus tôt possible. La méthode employée pour la détermination de la matière grasse est celle de GERBER. Les résultats sont exprimés par convention en grammes

2.1.Principe

Cette méthode est basée sur la dissolution des éléments du lait autres que la matière grasse par l'acide sulfurique sous l'influence de la force centrifuge et l'adjonction d'une petite quantité d'alcool iso-amylque. Ceci permet la séparation de la matière grasse en une couche claire et transparente dont les graduations du butyromètre révèlent le taux.

2.2.Mode opératoire

Avant de procéder à l'analyse, les échantillons doivent être conservés à une température de 20°C.

- Les butyromètres sont installés sur leur support et remplis de 10ml d'acide sulfurique. On évitera de mouiller le col.
- Le lait est homogénéisé par agitation .on prélève (10 ml) de lait qu'on introduit dans le butyromètre. Couler le lait très lentement afin d'éviter un mélange prématuré du lait dans l'acide.

Matériel et Méthodes

- L'alcool iso-amylique (1ml) est ensuite rajouté au mélange, en prenant soin de ne pas mouiller les cannelures du col. Les butyromètres sont enfin bouchés avec des bouchons secs et en bon états.
- Afin de dissoudre l'acide et les éléments du lait, les butyromètres sont agités avant de procéder à la centrifugation cette dernière dure 5 mn à 1200 Trs /mn.
- La lecture s'effectue directement sur le butyromètre dans lequel on remarque la présence de deux compartiments : le premier contenant la matière grasse (en haut), le second contenant les autres composants (en bas).
- Utiliser la tirette métallique pour agiter le ménisque avec un des traits de graduation du butyromètre. La teneur en matière grasse est exprimée en g/l.



Figure 05 : Lebutyromètre

3.La densité

La densité du lait est exprimée par le rapport des masses d'un même volume de lait et d'eau à température de 15 ou 20 °C. (POINTURIER, 2003).

3.1.Principe

Pour déterminer la densité du lait la méthode de référence est celle de pycnomètre à effleurement de 100ml environ de capacité, muni d'un thermomètre et d'un ajustage latéral. A défaut on peut utiliser une balance hydrostatique de précision. Pratiquement on la détermine à l'aide d'un thermo lactodensimètre.

3.2. Mode opératoire

- Homogénéiser l'échantillon de lait
- Verser dans une éprouvette de 500 ml
- Plonger le thermo-lacto-densimètre avec un moment de rotation
- Attendre la stabilité

- La lecture de la valeur de densité se fait au bord supérieur en fonction de la température. Densité corrigée = densité lue + 0,2 (température du lait - 20°C)



Figure 06 : le Thermolactodesimètre

II. Analyses microbiologiques

1.Préparation de l'échantillon

1.1.Préparation des dilutions

Introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1ml de lait testé, dans un tube stérile contenant au préalable 9 ml de l'eau stérile. Cette dilution est à 10^{-1} , puis introduire par la suite 1ml de Cette dilution 10^{-1} dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9ml de l'eau physiologique cette dilution est à 10^{-2} . Au moment de la réalisation des dilutions décimales, il est impératif de changer de pipettes entre chaque dilution.

1.2.Recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophiles (F.T.A.M)

Le dénombrement de la FTAM reste la meilleure méthode d'appréciation de la qualité microbiologique générale des aliments. Ces microorganismes se développent sur un milieu non sélectif et sont aptes à se multiplier à la température moyenne entre 25 à 40 °C.

1.2.1.Principe

Matériel et Méthodes

Le milieu prescrit pour le dénombrement de la FTAM estensemencé dans la masse dans des boîte de pétri. Après incubation à 30°C pendant 72heurs.Les colonies sont comptées. (**PETRINIENNE ET LAPIED, 1981**).

1.2.2.Mode opératoire

Prendre à l'aide d'une pipette stérile 1 ml d'une des dilutions décimales ensemencer le volume en masse dans une boîte de pétri stérile contenant le milieu Gelose Nutritive. L'inoculum est homogénéisé en réalisant des mouvements sous la forme de 8 puis on laisse les boîtes sécher.

Incuber les boîtes dans l'étuve à température de 30°C pendant 72h.

Retirer la boîte de pétri de l'étuve.

Dénombrer les colonies dans chaque boîte est on doit tenir seulement les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.



Fig 07 : Le dénombrement de la FTAM

1.3.Dénombrementdes coliformes

La dénomination coliforme s'applique aux bactéries en forme de bacilles Gram négative aérobies et facultativement non sporulées fermentant le lactose avec formation de gaz et d'acide a 37 °C(**BONNEFOY et al.,2002**).

1.3.1.Principe

Matériel et Méthodes

Le milieu prescrit pour le dénombrement des coliformes est ensemencé en masse dans des boîtes de pétri. Après incubation à 37 °C pendant 24h pour les coliformes totaux et à 44 °C pendant 24 h pour les coliformes fécaux. Les colonies sont comptées.

1.3.2.Mode opératoire

Prendre à laide d'une pipete stérile 1ml d'une dilution décimales ensemencer le volume en masse dans une boîte de pétri stérile du milieu VRBG((Gélose Glucosée Biliée au Cristal Violet et au Rouge Neutre). L'inoculum est homogénéisé en réalisant des mouvements sous la forme de 8 puis on laisser les boîtes sécher. Mettre la boîte dans l'étuve. Incuber à températures de 37°C pendant 24h pour les coliformes totaux et à 44 °C pendant 24h pour les coliformes fécaux.

Les coliformes apparaissent en masse sous forme de petites colonies d'un diamètre d'au moins 0.5mm de couleur rouge foncée.



Figure 08 : Dénombrement des coliformes sur milieu VRBG

1.4.Recherche des staphylocoques

Le dénombrement de cette espèce s'applique aux microorganismes formant des colonies caractéristique et/ou non caractéristique à la surface d'un milieu de culture sélectif et donnant une réaction fortement positive à la coagulas (BONNEFOY *et al*, 2002)

1.4.1. Mode opératoire

Matériel et Méthodes

Prendre à l'aide d'une pipete stérile 1ml d'une des dilutions décimales effectuées auparavant, et déposer le volume prélevé dans le tube du milieu préparé précédemment, puis agiter manuellement le mélange, ensuite ; introduire ce tube à essais à l'étuve de 37 °C pendant 24h. Les tubes ayant virés au noir seront considérés positifs

Les tubes positifs ont l'objet d'un isolement sur gélose CHAPMAN.

Faire fondre préalablement la gélose CHAPMAN puis couler la sur une boîte de pétri. Un prélèvement du tube positifs à l'aide d'une anse sera ensemercer en strier sur la surface de cette gélose, introduire la boîte de pétri à l'étuve. Enfin incuber à une température de 37 °C pendant 24h.

Les colonies apparaissent de tailles moyennes, lisses, brillantes et pigmentées de jaune dues à l'attaque du mannitol par *Staphylococcus aureus*.

En effet une souche de Staphylocoques qui fermente le mannitol du milieu de CHAPMAN et qui provoque la coagulation au bout de 24 h doit être considérée comme une souche de *Staphylococcus aureus*. Après résultat positif, un comptage de colonies est effectué.

1.5.Recherche des streptocoques

La dénomination Streptocoques fécaux s'applique aux bactéries arrondies qui se groupent en chainettes et qui donne un résultat positif avec les milieux d'enrichissement. (BONNEFOY *et al*, 2002)

1.5.1.Principe

Le milieu de présomption est ensemercé dans un tube à essais et incubé à une température de 37°C pendant 24h ; après culture positif, le milieu de confirmation est ensemencé et incubé également à une température de 37 °C pendant 24h, un comptage des colonies est réalisé après l'incubation.

1.5.2.Mode opératoire

Il comprend deux étapes :

1.5.2.a. Test présomptif

Matériel et Méthodes

Prendre à l'aide d'une pipette stérile 1ml d'une des dilutions décimales effectuées auparavant, auprès ce prélèvement déposer le volume prélevé dans de tubes contenant le milieu ROTHE n'oublier pas d'agiter manuellement les tubes contenant le mélange puis introduire les tubes à essais dans l'étuve, ensuite incubé à une température de 37°C pendant 24h.

Présomption de présence de Streptocoques fécaux dans les où il y'a un trouble du milieu de ROTHE

1.5.2.b. Test confirmatif

Ensemencer les tubes de LITSKY à partir de chaque tube de ROTHE positif, puis introduire les tubes de LITSKY dans l'étuve, ensuite incubé à une température de 37 °C pendant 24 h.

Il y'a présence de Streptocoques fécaux lorsque le milieu de LITSKY est troublé avec présence d'une pastille blanchâtre ou violète au fond des tubes.(ISO, 1984.)

1.6.Recherche des levures et moisissures

1. 6.1. Principe

Le milieu prescrit pour le dénombrement des levures et moisissure est ensemencé dans la masse dans une boite de pétri. L'incubation à 25 °C pendant 3 à 4 jours

1.6.2. Mode opératoire

Pour le dénombrement des levures et des moisissures, 15 à 20ml du milieu OGAGélose glucosée à l'oxytétracycline)sont coulés dans les boite de pétri codées conformément au codage pratiqué sur les tube de dilution, ensuite 0.1 ml de l'inoculum est coulé puis étalé en surface à l'aide d'un étaleur (pipette râteau). Puis mettre la boites de pétri dans l'étuve, incubé à une température de 25 °C pendant 3 à 4 jours. Après l'incubation, dénombrer séparément les levures et les moisissures.

2. diagnostic de la brucellose

2.1 .Matériel biologique

-Sang de vache.

2.2 .Réactifs : Suspension Rosâtre (Rose Bengale)

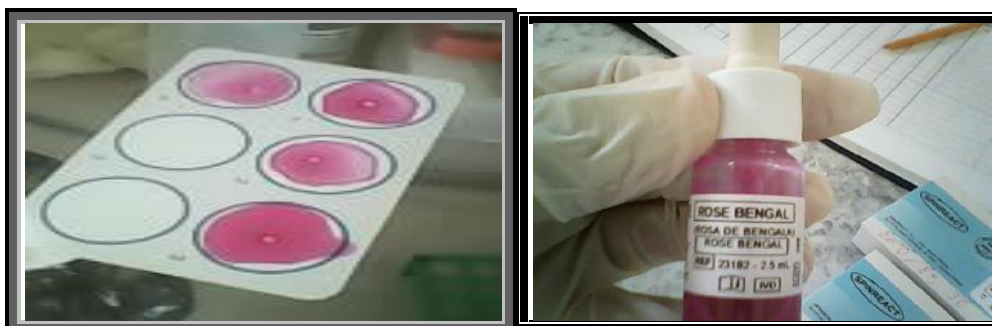


Figure 09: Microplaque en plastique **Figure 10. Le réactif Rose Bengale**

2.3. Test au Rose Bengale (RBT)

C'est une des méthodes les plus économiques et faciles à mettre en œuvre et la plus largement utilisée pour la mise en évidence des anticorps brucelliques dans les sérums. Les immunoglobulines responsables de la réaction sont les IgG et parfois les IgM en fonction du mode de préparation de l'antigène.

Le diagnostic et le dépistage sérologiques est très utilisé, sur sérum ou lait. **Bloquel R. et Veillet-Poncet L.**

2.4.. Protocole

Le test est une agglutination rapide sur lame de sérum par un antigène colore et à pH 3,6. L'antigène et le sérum à analyser sont mélangés à volumes égaux, et après 4 minutes de contact, la présence d'anticorps se traduit par la formation d'agglutinants visibles à l'œil nu. S'il n'y a pas d'anticorps spécifiques, le mélange reste homogène.

Le mode opératoire est le suivant :

-Prélever le sang .

-Placer les tubes du sang dans un Bain marie (38°C).

-Placer le sang dans une centrifugeuse pour séparer le sérum des autres compositions.

Matériel et Méthodes

- déposer sur une plaque, 50 μ L de chacun des sérums à tester.
- Agiter doucement le flacon d'antigène.
- Déposer 50 μ L de rose Bengale à côté de chacun des sérums.
- Mélanger soigneusement le rose Bengale et le sérum.
- Agiter la plaque pendant quatre minutes et lire immédiatement.

Il est préférable d'avoir un témoin positif (sérum infecté) et un témoin négati

2.5.Résultat

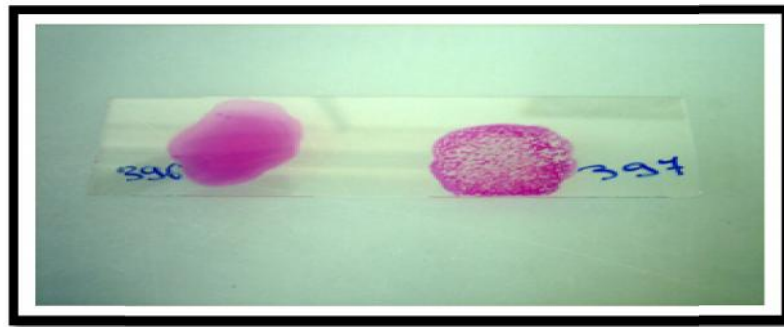


Figure 11. Réaction d'agglutination(Rose Bengale)

2.6.Lecture

Une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, donc le cas est négatif tandis que l'existence d'une agglutination, même minime soit-elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*, donc le cas est positif.

Résultats et Discussion

I. Résultats des analyses physico-chimiques du lait

I.1. détermination de l'acidité

Tableau 07 :Les valeurs de l'acidité du lait de vache

Acidité titrable((°D) Dornic)	Elhamma	Fais	Remila
Echantillon 01	17	18	17
Echantillon02	17	16	17

Selonle tableau 07 on constate que l'acidité de lait de nos échantillons varie de 16 à 18. Les variations de l'acidité sont liées au climat, au stade de lactation, à l'alimentation, à l'apport hydrique, à l'état de santé des vaches et aux conditions de la traite. Ces acidités titrables ne dépassent pas la norme FIL-AFNOR de l'acidité du lait frais fixée entre 16-18°D.

Cuq J.L. (2007).

1.2 .Détermination de la densité

tableau08 : Les valeurs de la densité de lait de vache

Densité du lait entier a 20C°	Elhamma	Fais	Remila
Echantillon 01	1.030	1.031	1.030
Echantillon 02	1.032	1.030	1.029

D'après tableau 08, il apparait que la densité est stable avec une faible variation entre 1.029-1.032. On note que ces échantillons ont des densités conforme à la norme FIL-AFNOR qui est de (1.030 - 1.032) avec une valeur inferieree la norme qui correspond a l'échantillon de Remila (1,029).

La densité dépend de la teneur en matière sèche, matièregrasse, de l'augmentation de la température et de disponibilités alimentaires.

Résultats et Discussion

1.3 détermination de la teneur en matière grasse

1.4 Tableau09 : la teneur en matière grasse de lait de vache

matière grasse g/l	Elhamma	Fais	Remila
jour 01	32	35	33
jour 02	31	33	33

D'après le tableau 09, il apparaît que le taux de la matière grasse du lait cru de nos échantillons d'étude varie de 31-35g/l au cours des prélèvements réalisés. Ces résultats sont légèrement inférieurs à ceux de docteur Nicolas le Berr en (2000) qui mentionne un taux en matière grasse de lait de vache de 35-45 g/l dans son livre. Les valeurs de la matière grasse sont largement inférieures par rapport aux valeurs déclarées par l'AFNOR (34-36 g/l). La variabilité de la teneur en matière grasse dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques, le stade de lactation et l'alimentation.

Résultats et Discussion

II. Résultats des l'analyses microbiologiques

Les valeurs des résultats obtenus au niveau de laboratoire de l'unité de production de « EL Awres » ont révélés des résultats presque identiques pour toute la période d'étude. Le tableau si dessous montre les résultats des l'analyses microbiologiques du lait de vache de nos échantillons.

Tableau 10 : Résultat de dénombrement microbiologique du lait de vache

Les indicateurs de qualité	Nombre des germes UFC /ml
Flore totale Aérobie Mésophile	13.10 ²
Coliformes totaux	28.10 ²
Coliformes fécaux	10
Staphylococcus aureus	-
Streptocoques fécaux	-
Levures et moisissures	117

La flore mésophile aérobie totale (FMAT), est un bon indicateur de contamination, est dénombrée sur GN 24 h à 30°C. Le lait cru examiner contient une charge de la FMAT, qui est égale à 13.10² UFC. Ces résultats sont inférieurs à la norme 10⁵ (journal officiel N35) ce qui indique que notre échantillon du lait est consommabl

Les coliformes sont recherchés sur (VRBG) est incubée 24 heures à 37°C pour les coliformes totaux et a 44°C pour les coliformes fécaux. Les échantillons de lait cru examinées contiennent une charge des coliformes totaux de 28.10² UFC et 10 UFC pour les coliformes fécaux.

Résultats et Discussion



Figure 13 : Aspect macroscopique des colonies de coliformes

Les staphylocoques sont absents dans nos échantillons. L'absence de staphylocoque indique une bonne santé des vaches et bonnes hygiènes de la traite. Les streptocoques sont absents aussi. Les taux streptocoques est en rapport avec l'état de santé des vaches, les conditions hygiéniques de la traite, et l'éventuelle contamination au cours du dénombrement.

Idem pour le diagnostic de la brucellose, les tests négatifs montre l'absence de ce germe *Brucella* dans nos échantillons.

Les levures et les moisissures sont dénombrées sur le milieu OGA et incubé 5 jours de culture. Une croissance très abondante, après 5 jours de culture. Apparition d'un ensemble de filaments et de mycéliums non-ramifiés, et présence des levures. Nous avons constaté que leur taux est même assez important dans le lait cru, ce qui n'est pas souhaitable, malgré qu'elles représentent la flore saprophytes.



Figure 14 : Aspect macroscopique des colonies de levures et de moisissures après 05 jours de culture.

Conclusion

La consommation accrue du lait, dépend essentiellement de sa qualité nutritionnelle, microbiologique et physico-chimique. Pour mieux bénéficier de ce produit complet, il est important de veiller sur une bonne qualité depuis la traite jusqu'au stade du produit fini.

A cet effet, notre étude consiste à un contrôle microbiologique et physico-chimique du lait cru, ainsi qu'un diagnostic de la brucellose dans les mêmes échantillons de lait cru collectés et puis analysés au niveau de l'unité de production **Alawres**.

Concernant la densité et le teneur en matière grasse ainsi l'acidité titrable, il a été remarqué, que la majorité des échantillons prélevés répondent aux normes. Ainsi que la recherche FTAM, les coliformes, staphylocoques, les streptocoques et les levures moisissures reflètent une qualité microbiologique relativement bonne et acceptable selon le journal officiel de la République Algérienne des aliments.

Pour le diagnostic de la brucellose, les tests négatifs montre l'absence de cette infection dans nos échantillons de sang.

On peut conclure que le produit analysé est de qualité microbiologique et physico-chimique satisfaisante.

Références bibliographiques

- AFNOR. (2001) .** Contrôle de la qualité des produits laitiers –Analyses physiques et chimiques, 3ème édition
- Agabriel C., Coulon J.B., Journal C. et De Rancourt B. (2001).**
Composition chimique du lait et systèmes de production dans les exploitations du massif central. INRA. Prod. Anim., 14(2). pp : 119-128.
- Aggad H., Mahouz F., Ahmed Ammar Y. et Kihal M. (2009).** Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l’ouest algérien. Revue Méd. Vét., 160, 12. pp :590-595.
- Alais C. (1984).** Sciences du lait. Principes de techniques laitières. 3ème édition, édition Publicité France.p 162-163.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y ., Paquin P ., Simpson R et Turgeon H.,(2002).**Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologiques et Techniques d'analyses du lait IN VIGNILA C.L, Science et technologie du lait – Transformation du lait, Ecole Polytechnique de Montréal,:3-25-29 (600 pages).
- Amhour, F., Said B., Hamama, A. et Zahar M. (1998).** Qualité microbiologique du lait cru: Cas de la région d'Errachidia. Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc) 18 (1). pp : 31-35.
- ARRÊTÉ INTERMINISTÉRIEL du 25 janvier 1998 (JORA)** relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées. Ministère du commerce. JORA N°35, 1998, Algérie.
- Araba A. (2006).** L'alimentation de la vache laitière pour une meilleure qualité du lait. Comment augmenter les taux butyreux et protéique du lait. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA n°142 vache laitière. Transfert de technologie en agriculture. Ministère De L'agriculture, Du Développement Rural Et Des Pêches Maritimes.
- Auclair J. (1979).** Influence des méthodes de réfrigération et de collecte

Références bibliographiques

du lait sur sa qualité bactériologique. Revue française lait n°378. 37.

Boutonnier J.L. (2008). Matière grasse laitière Composition, organisation et propriétés. Dans Techniques de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire (F 6320), Paris.

Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Revue Méd. Vét., 151, 11.pp: 1003-1010

Brule G., (2004). Progrès technologiques au sein des industries alimentaires impact sur la qualité des produits La filière laitière, Rapport commun de l'Académie des technologies et de l'Académie d'Agriculture de France : 8 (24 pages).

Bloquel R. et Veillet-Poncet L. (1980). Evolution et détermination de la flore bactérienne d'un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. Revue Le lait. pp :474-486.

Brisabois A., Lafarge V., Brouillard A., de Buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B. et Thorel M.F. (1997). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1). pp: 452-471.

Clausen E.M., Green B.L et Litsky W. (1977). Fecal streptococci: indicators of pollution. Dans: Hoadley, A.W et B.J Dutka, édit., Bacterial Indicators/Health hazards associated with water. American Society for Testing and Materials, ASTM STP 635, pp: 247-264.

Cuq J.L. (2007). Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25.

Références bibliographiques

Delbecchi L., D. Petitclerc and P. Lacasse., (2001).Effect of 17 β -estradiol on Milk production and mammary gland involution in Holstein cows in mid-late lactation.Journal of DAIRY Science 84(supp 11): 312.

Debry G ., (2001). Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 21 (566 pages).

Dieng M. (2001). Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois. Thèse Docteur vétérinaire, Université de Dakar Sénégal.

Dumont J.P, Delespaul G., Miguot B. et Adda J. (1977). Influence des bactéries psychrotrophes sur les qualités organoleptiques de fromages à pâte molle. Mémoires originaux. Le lait. pp :569-570.

Edberg SC., Rice EW., Karlin RJ. et Allen MJ. (2000). Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, 88.pp :106-116..

Euzeby J.P. (2003). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Edition Euzeby.

FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO Alimentation et nutrition n°28.

Franworth. Et Mainville I., (2010).Le contrôle d'hygiène du lait liquide dans hygiène du lait. OMS n°48. pp : 309-324.

Fredot E., (2006).Etude sur les variations de la densité du lait de mélange. International dairy journal. pp :333-334.

Gosta., (1995).Les composants de traitement du lait. In :Manuel de transformation du lait.Sweden: edition Tétra pakprocessing system A. B.

Références bibliographiques

Guiraud., (2003).Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In : Microbiologie alimentaire. Paris.

Gaucheron F., (2004). Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier : 783 (922 pages).

Gay MF., Jaubert G. et Saboureau S. (1993) .Qualité hygiénique du lait de chèvre Incidence des traitements technologiques sur la qualité hygiénique du lait et des fromages de chèvre à pâte molle. Lait n° 73. pp :499-509.

Jakob E., Winkler H., Schaeren W., Amrein R. et Geinoz M. (2011). La qualité du lait cru un défi permanent. Edition AgroscopeLiebefeld-Posieux forum n°78 f.pp :5-17

Jay, J. M. (2000). **Taxonomy, role, and significance of microorganisms in food.**Dans **Modern Food Microbiology, Aspen Publishers, Gaithersburg MD.13p.**

J.O.R.A (Journal Officiel de la République Algérienne N°35 le 27 Mai 1998

Mankai M., Mnasser H. et Boudabous A. (2003). Influence de la durée de réfrigération sur la microflore psychrotrophe, la protéolyse et la composition chimique et minérale du lait cru de collecte tunisien. Editions de Courcelles vol. 120, no12. pp :12-17.

Marcel Mazyoyer., (2007). Larousse agricole Edition Larousse Paris France p 115-116-374-375-405.

Mathieu J., (1999). Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, Lavoisier, Paris : 3-190 (pages).

Références bibliographiques

Michel A et Wattiaux., (2000). « Lactation et récolte du lait. » «Institut Babcock pour la recherche et le développement international du secteur laitier. UW.» Madison, Wisconsin pp 3-30, 60-72.

Michel V. (2005). Peut on agir sur la flore microbienne du lait ? Action sur la flore. Edition GIS Alp du Nord. pp : 2-3.

Ministère de l'agriculture et du développement rural. (2009). Communication sur le développement de la production laitière.

Neville MC et Jensen RG. (1995). Les propriétés physiques des laits humain et bovin à Jensen R., Manuel de lait Composition général description des laits Academic Press, Inc : 82 (919 pages).

Nicolas Le Berre., (2000). Soyons moins lait, Terre vivante.

Ollivier-Bousquet M., (1999). Contrôle hormonal de la caséine sécrétion dans «Biologie de la lactation». J.Martinet, N.H.chef EDR Editions, Paris 1999.pp 429-451.

Olivieri VP. (1982). Bacterial indicators of pollution.Dans: Pipes.WO: Bacterial indicators of pollution, edit CRC Press, pp: 21-41.

Petre goût et Gisele Livres Reiser. (2010). Des études sur les bienfaits du lait de chèvre, ALP, Berlin.

Pointurier H., (2003). La gestion matière dans l'industrie laitière, Tec et Doc, Lavoisier, France : 64 (388 pages).

Pougheon S., (2001). Contribution a l'étude de variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France : 34 (102 pages).

Références bibliographiques

Rakotomalala R.(2012). Analyse de corrélation. Etude des dépendances –variables quantitatives. Université Lumière Lyon 2.pp :3-26.

Ramet J.P. (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Collection FAO Alimentation et nutrition n°48.

Thieulin G., Basille D., Pantaleon J., Rosset R., Gandon Y. et Petit A. (1966). Recherche des staphylocoques pathogènes dans le lait et les produits laitiers. Mémoires originaux. Le lait n°453-454.pp :131-140.

Thieulon M. (2005). Lait pathogènes staphylocoques. Revue de la chambre d’agriculture du Cantal. pp :1-2.

Thieulin G.et Vuillaume R.(1967). Eléments pratiques d’analyse et d’inspection du lait de produits laitiers et des œufs –revue générale des questions laitières 48 avenue, PR2SIDENT Wilson ? Paris : 71-73(388 pages).

Veisseure., (1997).Technologie du lait : constituants, traitement et transformation du lait. Edition, La maison rustique. Paris.

Vela G.R. (1997). Microbiology of milk. Dans Applied Food Microbiology, Star Publishing, Belmont, CA, 325p.

Vignola C. (2002). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75.

Vierling E.(2008). Aliments et boissons filières et produits. 3éme édition Biosciences et techniques.Paris.pp :15-16.

Références bibliographiques

ANNEXES

Annexe 1:

VRBG

composants	teneur
Extrait de levure	0.3g
Peptone	7g
Chlorure de sodium	5g
SELS biliaries	1.5g
Glucose	10g
Rouge neutre	0.03g
Cristal violet	0 .002g
Agar	12g
Eau	1000 ml

Ph=7.4

ROTHER

composants	teneur
Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate mono potassique	2.7g
Acide de sodium	0.2g
Eau	1000ml

Ph=7

Repartir en tubes a essais (9-10ml).

Autoclave 20 minutes a 115°c .

Ce milieu peut être préparé a double concentration et en multiple

LITSKY (bouillon a l'acide et l'éthyle – violet = bouillonEVA)

composants	teneur
Peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2.7g
Phosphate mono potassique	2.7g
Acide de sodium	0.3g
Ethyle - violet	0.7

PH = 7

- Repartir en tubes a essais (8 – 10ml).

- Autoclave 20 minutes a 115°c

OGA (gélose oxytétracycline – glucose)

ANNEXES

composants	teneur
Extrait	5g
glucose	20g
gélose	16g

PH = 7

- Repartir en tubes a essais (8 – 10ml).
- Stériliser par ébullition 10 minutes(ne pas autoclaver).