

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1

**Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie**

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

THEME

**Contrôle de la qualité bactériologique et recherche des
résidus d'antibiotiques dans le lait de vache cru
commercialisé dans la wilaya de Blida**

Réalisé par :

Mansour Khadîdja

Soutenu le : 18/12/2014

Devant le jury:

Mme MATMOURA A.	MAB	Université Blida 1	Présidente
Mme KHEDAM H.	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	MCB	Université Blida 1	Promoteur
Mme AMAROUCHE N.	MAA	Université Blida 1	Co-promotrice

Promotion 2013/2014

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Dieu pour sa clémence et qui m'a donner le courage, la volante et surtout la sante pour réaliser ce travail.

C'est un plaisir qu'un devoir pour d'exprimer ma gratitude à toutes les personnes ayant contribué, chacune a sa manière, pour le bon déroulement de ma formation.

Mes vifs remerciements a ma promoteur M. BOUKHATEM M.N. d'avoir accepté de m'encadre dans la réalisation de ce mémoire.

Tous mes remerciements vont à Mme AMAROUCHÉ N

Je tiens à remercier l'examinatrice Mme MATMOURA A qui aimablement accepte de faire partie de mes jurys de thèse.

Tous mes remerciement a Mme KHEDAM H qui m'accorde l'honneur d'examiner mon travail.

Mes infiniment remerciements et mon profond respect a toute l'équipe de laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida pour m'avoir accueillir au sein de leur organisme.

Je tiens a remercié Mme Amina et toutes l'équipe de centre de collecte Blida Danone.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble des enseignants de départements de biologie qui ont contribué à notre formation.



Dédicaces

Très cordialement, je dédie le fruit de mes études à :

La mémoire de ma sœur Amina, qui ma toujours soutenu et qui aurait été fière de voir l'accomplissement de mes études. J'espère que, Puisse Dieu, le tout Puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

A ma chère mère pour m'avoir aidée et soutenue, en témoignage de tout mon amour et me profonde reconnaissance.

A mon cher père, grâce à son encouragement, sa confiance et son soutien moral et matériel et pour son amour infini en exprimant mes gratitudes, mon profond amour et ma passion.

A mes chers frère : Abdnacer et Abdelmalek.

A mes chères sœur : Amel, Imane et Khaoula.
En leurs espérant le plein succès dans leur vie.

A ma chère amie Amina.

A mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines et toute la famille, Que Dieu vous garde!

A ma chère amie Soumia et son marie Abdellah qui ont encouragé le long de mon travail.

A mes amis et collègues : Fatma Zohra, Khadîdja, Meriem, Djahida et Rafika.

Et tous ceux qui m'estiment et qui m'aiment.

TABLE DES MATIERES

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Résumé

Abstract

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation générale du lait	3
1.2. Mamelle : anatomie et sécrétion du lait	3
1.3. Propriétés physico-chimiques du lait	3
1.4. Facteurs de variation de la composition du lait	7
1.4.1. Facteurs liés à l'animal	7
1.4.1.1. Facteurs physiologiques	8
1.4.1.2. Facteurs pathologiques : les mammites	8
1.4.2. Facteurs d'environnement	8
1.5. Éléments biologiques du lait	9
1.5.1. Microorganismes	9
1.5.2. Facteurs affectant le développement des germes	9
1.4.3. Flore lactique	10
1.4.4. Contaminants du lait	10
1.4.4.1. Antibiotiques	13
1.5. Qualité et modalité de paiement du lait cru	13
6. Impacts économiques et sanitaires de la qualité du lait cru	14

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Zone d'étude et échantillonnage	15
2.2. Matériels	15
2.3. Méthodes	15
2.3.1. Analyses microbiologiques	15
2.3.1.1. Techniques d'analyse et préparation des dilutions	16
2.3.1.2. Recherche et dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile Totale	16

2.3.1.3. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et thermo-tolérants	17
2.3.1.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	19
2.3.1.5. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3.1.6. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs	22
2.3.1.7. Recherche des salmonelles	23
2.3.2. Recherche des résidus d'antibiotiques	24

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats des analyses bactériologiques	28
3.1.1. Recherche et dénombrement de Flore Aérobie Mésophiles Totale	28
3.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux	30
3.1.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	33
3.1.5. Recherche et dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.1.6. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium</i> sulfito- réducteurs	37
3.1.7. Recherche et dénombrement des Salmonelles	37
3.2. Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques (ATB)	38

CONCLUSION	41
-------------------	----

Références Bibliographiques	43
------------------------------------	----

Annexes	
----------------	--

LISTE DES TABLEAUX

TITRE	PAGE
Tableau 1.1 : Composition chimique du lait (g/l).	4
Tableau 2.2 : Acides aminés essentiels et non-essentiels du lait.	6
Tableau 2.1 : Caractéristique, milieux sélectifs et objectif de la recherche de la FAMT.	17
Tableau 2.2 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de la recherche des coliformes Totaux et coliformes fécaux ou thermo-tolérants.	18
Tableau 2.3 : Milieux sélectifs et but de recherche des streptocoques fécaux.	19
Tableau 2.4 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche des <i>S. aureus</i> .	21
Tableau 2.5 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche des <i>Clostridium</i> .	22
Tableau 2.6 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche de salmonelles.	23
Tableau 3.1 : Normes microbiologiques du lait de vache cru selon le Journal Officiel.	28
Tableau 3.2 : Résultats du dénombrement de la Flore Totale Aérobie Mésophile.	29
Tableau 3.3 : Résultats de la recherche et du dénombrement des coliformes totaux.	31
Tableau 3.4 : Résultats du dénombrement des coliformes thermo-tolérants à 44°C.	31
Tableau 3.5 : Résultats de la recherche et du dénombrement des streptocoques fécaux.	33
Tableau 3.6 : Résultats de la recherche et du dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .	35

LISTE DES FIGURES

TITRE	PAGE
Figure 2.1 : Préparation des dilutions décimales.	16
Figure 2.2 : Bouillons VBL pour le dénombrement des coliformes (Test de présomption).	19
Figure 2.3 : Repiquage des streptocoques fécaux dans le milieu Rothe.	20
Figure 2.4 : Coffret de Delvotest.	24
Figure 2.5 : Etapes à suivre en appliquant le Delvotest.	26
Figure 2.6 : Incubation des ampoules.	26
Figure 2.7 : Interprétation des résultats Delvotest.	27
Figure 2.8 : Résultats des analyses par Delvotest.	27
Figure 3.1 : Recherche des coliformes thermo-tolérants après le test de confirmation.	32
Figure 3.2 : Pastille blanchâtre au fond du tube Eva Litsky positif.	34
Figure 3.3 : Noircissement du milieu Giolitti Contonii après incubation.	36
Figure 3.4 : Colonies pigmentées sur gélose Chapman avec virage de milieu au jaune	36
Figure 3.5 : Colonies noirs des spores du <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs dans la gélose Viande-Foie.	37
Figure 3.6 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache cru commercialisé au niveau de la wilaya de Blida.	38

LISTE DES ABREVIATIONS

ATB	Antibiotique
ADH	Arginine Dihydrolase
BEA	Gélose Bile Esculine Azide
CF	Coliforme Fécaux
CT	Coliformes Totaux
EPEI	Eau Peptonée Exempte d'Indole
FTAM	Flore Aérobie Mésophile Totale
GN	Gélose Nutritive
LDC	Lysine Décarboxylase
NPP	Nombre Plus Probable
ODC	Ornithine Décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	Ortonitrophénol-Bêta-Galacto-Pyranoside
PCA	Gélose Plate Count Agar
SFB	Bouillant Sélénite Cystéine
TDA	Tryptophane Désaminase
TSE	Tryptophane Sel Eau
TSI	Triple Sugar Iron
VBL	Bouillon Lactose Biliée au Vert Brillant
VF	Viande Foie
UFC	Unite Formant Colonie

RESUME

Le lait constitue un milieu favorable à la croissance de plusieurs microorganismes dont certains sont pathogènes. Il doit répondre à des normes drastiques, afin d'assurer une qualité irréprochable tant sur le plan microbiologique que toxicologique.

En vue d'apprécier les risques microbiologiques liés à la consommation de cet aliment, nous avons conduit cette étude afin d'apprécier la qualité microbiologique du lait de vache cru (54 échantillons) commercialisé au niveau de différentes communes de la wilaya de Blida.

Les échantillons analysés étaient non satisfaisants en ce qui concerne la Flore Aérobie Mésophile Totale où 61.11% des prélèvements sont considérés de qualité non acceptable, les coliformes thermo-tolérants (40.74%), les streptocoques fécaux (55.55%) ainsi que les staphylocoques (74.07%). Une absence totale de salmonelles a été notée. Même constat a été rapporté pour les *Clostridium* sulfite-réducteurs. Par ailleurs, les résidus d'antibiotiques ont été retrouvés dans 26% des prélèvements analysés. Ces résultats témoignent du non respect des règles de bonnes pratiques d'hygiène au niveau de la traite, de la conservation, du transport et de la vente du lait. Le lait de vache consommé cru présente un risque sanitaire sérieux pour la population des zones d'étude.

L'encadrement zootechnique des acteurs et la vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène, tout au long de la chaîne de production, sont nécessaires pour l'amélioration de la qualité du lait local.

Mots-clés : Lait de vache, Qualité microbiologique, Coliformes, Antibiotiques, Blida.

ABSTRACT

Bovine raw milk represents a favorable environment for the growth of several food-spoilage strains and some pathogens. It must meet stringent standards to ensure the highest microbiological and toxicological qualities.

In order to assess the microbiological risks associated with the consumption of this food, we conducted this study to determine the microbiological quality of bovine raw milk (54 samples) commercialized at the state of Blida (Algeria).

The samples analyzed were unsatisfactory in terms of total flora where 61.11% of samples were considered as non acceptable in terms of quality standards, fecal coliforms (40.74%), fecal streptococci (55.55%) and staphylococci (74.07%). *Salmonella* and *Clostridium* strains were not detected in all the samples. Furthermore, antibiotic residues were found in 26% of analysed samples. These results reflect non-compliance with the rules of good hygiene practices at milking, storage, transportation and sale of milk. Bovine raw milk consumed presents a serious health risk to the population of the study areas.

The livestock coaching actors and dissemination of good hygiene practices throughout the production chain are needed to improve the quality of local milk.

Keywords: Bovine raw milk, Microbiological quality, Fecal coliforms, Antibiotics, Blida.

INTRODUCTION

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de 3 milliards de litres par an. Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des Algériens ; il apporte la plus grande part de protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière lait connaît une croissance annuelle de 8%. Avec un taux de collecte inférieur à 15%, cette filière reste, cependant, fortement dépendante de l'importation de poudre de lait (**El Hassani, 2013 ; Belhadia et al., 2014**).

La flambée des prix de cette matière première sur le marché international a conduit les pouvoirs publics à mettre en œuvre un programme quinquennal (2005-2010) d'intensification des productions agricoles, à l'effet d'augmenter la production de lait de vache et de l'intégrer dans les circuits de la production (**El Hassani, 2013**). En effet, selon l'Office National Interprofessionnel du lait en 2009, la production de lait cru a permis, de par son intégration dans le processus de transformation au niveau des laiteries, d'abaisser la facture d'importation de poudre de lait à environ 400 millions de dollars, contre 750 millions en 2008 (**El Hassani, 2013**).

Cependant, la production du lait de vache se heurte souvent au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs. Les conditions d'hygiène au niveau des fermes, le maintien de la chaîne du froid tout le long du circuit de la production jusqu'à l'arrivée du lait à la laiterie, comportent autant de sources de contamination à maîtriser afin de préserver la qualité hygiénique du lait (**Kouamé-Sina et al., 2010 ; Ghazi et Niar, 2011**).

Le lait cru est un produit hautement nutritif. Sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine. En effet, des souches pathogènes pour l'homme et l'animal, pouvant avoir acquis des résistances multiples aux antibiotiques (ATB), peuvent y proliférer (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009 ; Titouche et al., 2013 ; Mensah et al., 2014**). Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles.

Le lait cru, ou lait n'ayant subi aucun traitement d'assainissement, peut contenir des bactéries appartenant à plusieurs germes microbiens (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*) qui peuvent causer des maladies d'origine alimentaire (**Butel et Ouzrout, 2012**).

Ignorants des bonnes pratiques d'hygiène, les acteurs de la filière laitière local, contribuent à la dissémination et à la multiplication des germes pathogènes dans le lait lors de la traite et de la commercialisation.

Différentes études ont été menées pour déterminer les origines de la contamination du lait à la production en vue de mettre en place, au sein de ces filières, des programmes de lutte adaptées et préserver la santé des consommateurs (**Aggad *et al.*, 2009 ; Ghazi et Niar, 2011 ; Hakem *et al.*, 2013**). De ce fait, les connaissances sur la qualité microbiologique du lait en Algérie sont limitées aux données fragmentaires sur les germes aérobies totaux, les lactobacilles, les *Entero-bacteriaceae*, les levures et les moisissures (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**).

Plusieurs facteurs de risques de contamination du lait aux différents stades de sa production entrent en jeu, ce qui nous a incités à réaliser ce travail, dont l'objectif principal était la mise en évidence de la qualité hygiénique et sanitaire du lait de vaches cru commercialisé au niveau de différentes communes de la wilaya de Blida. Par ailleurs, l'objectif assigné à ce travail consiste à rechercher et dénombrer les germes indicateurs de la qualité hygiénique (flore totale, coliformes et streptocoques fécaux) ainsi que les espèces pathogènes (salmonelles et staphylocoques à coagulase positive) pouvant présenter un risque sur la santé du consommateur. De plus, les résidus d'antibiotiques ont été recherchés, dans tous les échantillons, conformément aux normes nationales en vigueur.

Ce mémoire s'articule sur trois chapitres :

- Chapitre 1 : consacré à une synthèse bibliographique rassemblant des données concernant le lait, ses propriétés ainsi que sa composition et sa qualité hygiénique et sanitaire.
- Chapitre 2 : décrit les techniques expérimentales pour lesquelles nous avons opté compte tenu des objectifs de ce présent travail. Ainsi, le matériel et méthodes analytiques mis en oeuvre tout au long de ce travail sont présentés.
- Chapitre 3 : regroupe l'ensemble des résultats acquis au cours de différentes analyses aux laboratoires avec leurs interprétations et discussion.

Une synthèse et une conclusion générale couronnent le travail effectué.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Présentation générale du lait

Le lait est un liquide sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune mammifère (**Pougheon, 2001**). Il correspond à une alimentation parfaitement adaptée aux besoins du nouveau-né (**Cayot et Lorient, 1998**). C'est un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6.6 à 6.8) légèrement acide, proche de la neutralité (**Pougheon, 2001 ; Aboutayeb, 2009**).

Le lait, proche du plasma sanguin, est un sérum comportant une émulsion de matière grasse, une suspension de matière protéique caséuse, du lactose, des sels et minéraux, des protéines solubles et des traces d'éléments divers (**Pougheon, 2001**).

Les principaux constituants du lait sont donc par ordre décroissant :

- de l'eau très majoritairement ;
- des glucides principalement représentés par le lactose ;
- des lipides essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras ;
- des protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles ;
- des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire ;
- des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines et oligo-éléments.

Le lait est ainsi le seul aliment des nouveaux-nés mammaliens et il y a autant de laits différents qu'il existe de mammifères au monde. La dénomination «lait» sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (**Larpen, 1997**). La vache assure de très loin la plus grande part de la production mondiale (90%) (**Alais et al., 2003**), ce lait est le produit laitier le plus consommé et le plus étudié en nutrition humaine (**FAO, 1998**).

1.2. Mamelle : anatomie et sécrétion du lait

Le lait est un mélange liquide de nombreuses substances. Il est sécrété par les glandes mammaires des femelles mammifères (**Mathieu, 1998**). La mamelle est une glande présente chez tous les mammifères et sa fonction est de produire le lait.

La mamelle ou pis est une glande tégumentaire, d'origine ectodermique et mésodermique, de structure tubuloalvéolaire ramifiée (**Pavaux, 1982**). Le tissu mammaire de la vache est lourd et volumineux. Son ensemble peut, chez la vache adulte, peser plus de 50 kg (**Hanzen, 2009**).

1.3. Propriétés physico-chimiques du lait

Le lait est un milieu hétérogène dans lequel trois phases distinctes coexistent (**Pougheon, 2001 ; Debry, 2001**) :

- la phase aqueuse, qui contient l'eau (87% du lait) et les produits solubles pouvant donner naissance au lactosérum (lactose, sels, protéines solubles, composés azotés non protéiques, biocatalyseurs tels que vitamines hydrosolubles ou enzymes) ;
- la suspension colloïdale micellaire (2,6%), qui peut donner naissance au caillé obtenu par coagulation des caséines suite à l'action de microorganismes ou d'enzymes ;
- l'émulsion (4,2%), qui peut donner naissance à la crème, une couche de globules gras rassemblés à la surface du lait par effet de gravité.

1.3.1. Composition chimique

Le lait est un édifice physico-chimique extrêmement complexe qui contient des trésors de richesse nutritionnelles articulés autour de quatre nutriments principaux, qui sont : les protéines, les glucides, les lipides et les sels minéraux (**Tableau 1.1**) ; ainsi que d'autres éléments qui sont : les vitamines (hydrosolubles – liposolubles) et les enzymes (**Luquet, 1990**).

Tableau 1.1 : Composition chimique du lait (g/l) (**Baaziz, 2005**).

Eau	902
Matière sèche	130
Glucides (lactose)	49
Matière grasse	39
lipides	38
phospholipides	0,5
composés liposolubles	0,5
Matière azotée	33
protéines	32,7
caséines	28
protéines solubles	4,7
azote non protéique	0,3
Sels	9
Biocatalyseurs, enzymes, vitamines	Traces

1.3.1.1. Eau

L'eau est le constituant le plus important du lait en proportion. La présence d'un dipôle et de doublet d'électrons libre lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire est ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum (**Vignola, 2002**).

1.3.1.2. Glucides

Ils forment avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques, l'un des principaux groupes de substances des êtres vivants (**Mathieu, 1998**). Le lait contient deux types de glucides (**Pougheon, 2001**) :

- Les glucides libres et dialysables (oligoholosides)
- les glucides combinés en glycoprotéines et non dialysables.

1.3.1.3. Matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait sous forme de globule gras de diamètre de 0.1 à 10 μ m (**Mahaut et al., 2005**), elle se compose principalement de triglycérides et de phospholipides et d'une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (**Vignola, 2002**). Elle est solide à température ambiante (c'est une graisse) et presque entièrement libre et se trouve en fine dispersion dans les globules gras.

- Les lipides polaires sont surtout des phospholipides, ils ne forment que 1% du total ; ils sont principalement sous forme liée dans la membrane globulaire.
- Les lipoïdes insaponifiables, insolubles dans l'eau, mais de nature très différente, constituent les restes. Ils rassemblent principalement les carotènes et les stérols, qui comprennent les vitamines A et D (**Alais et al., 2003**).

1.3.1.4. Protéines

Les protéines sont des éléments essentiels (**Tableau 1.2**) au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers (**Vignola, 2002**). Le lait contient deux sortes de protéines : Les caséines, qui coagulent lorsqu'on lui ajoute un acide ou la présure. Les protéines, qui dans ces conditions restent en solution dans l'eau du caillé et du sérum ou « petit lait » qui s'en échappe, sont qualifiées de solubles ou de sériques (**Mathieu, 1998**).

Tableau 2.2 : Acides aminés essentiels et non-essentiels du lait (**Vignola, 2002**).

Acides aminés essentiels	Acides aminés non essentiels
Méthionine	Acide glutamique
Phénylalanine	Tyrosine
Leucine	Asparagine
Thréonine	Ornithine
Lysine	Acide aspartique
Arginine	Alanine
Isoleucine	Glutamine
Histidine	Glycine
Valine	Sérine

1.3.1.5. Minéraux

Le lait contient un certain nombre de minéraux, leur concentration totale est inférieure à 1%. Les sels les plus importants sont les sels du calcium, sodium, potassium et magnésium (**Alais et Linden, 1997 ; Vignola, 2002**).

1.3.1.6. Vitamines

Ce sont plutôt complexes mais de taille beaucoup plus faible que les protéines, de structures très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique (**Debry, 2001 ; Pougheon, 2001**). On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait ;
- vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) associées à la matière grasse, certaines au centre du globule gras et d'autres à sa périphérique (**Debry, 2001**)

1.3.1.7. Enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produite par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques.

Une grande partie se retrouve dans les membranes des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes. La distinction entre éléments natifs et éléments extérieurs n'est donc pas facile (**Debry, 2001 ; Mathieu, 1998**).

Les principaux enzymes du lait sont les hydrolases, les déshydrogénases et les oxygénases. Les deux principaux facteurs qui influent sur l'activité enzymatique sont le pH et la température (**Vignola, 2002**)

1.4. Facteurs de variation de la composition du lait

La composition chimique du lait et ses caractéristiques technologiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs. Ces principaux facteurs de variation sont bien connus, ils sont liés soit à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire) soit au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation). Cependant, si les effets propres de ces facteurs ont été largement étudiés, leurs répercussions pratiques sont parfois plus difficiles à interpréter compte tenu de leurs interrelations (**Pougheon, 2001**).

1.4.1. Facteurs liés à l'animal

1.4.1.1. Facteurs génétiques

La race de l'animal influence la composition du lait. Il y a également des différences significatives dans la composition du lait entre vaches de même race, dans les mêmes conditions du milieu et d'alimentation (**Alais et Linden, 1997**). La variation inter-races est importante pour le taux butyrique, intermédiaire pour les protéines et faible pour le lactose. Les taux de calcium, phosphore, potassium et sodium sont fortement héréditaires (**Hanzen, 2009**).

1.4.1.2. Facteurs physiologiques

Physiologiquement, la composition est influencée par quatre facteurs en l'occurrence : le colostrum, le stade de lactation, le numéro de lactation et la rétention de lait (**Hanzen, 2009**).

- Le colostrum est un liquide jaune visqueux, à réaction acide présent dans la mamelle quelques jours avant et après l'accouchement. Son taux de protéines y est très élevé du fait de la concentration élevée en immunoglobulines.
- La quantité de matières grasses diminue jusqu'au pic de lactation puis augmente par la suite à raison de 0.05% par mois. La plupart des études rapportent une diminution du taux protéique au cours des premiers jours de lactation avec une concentration minimale au moment du pic de production.
- L'influence du moment de lactation est faible. Certaines modifications peuvent être imputées à une détérioration de l'état sanitaire de la mamelle avec l'âge. Le taux butyrique augmente avec l'âge de l'animal.
- La rétention de lait peut être due à un stress, une lésion du pis, une traite défectueuse, une interruption de la traite ou de la tétée ou à une absence de traite.

1.4.1.3. Facteurs pathologiques : les mammites

D'une manière générale, plus la mammité est grave et plus la composition du lait se rapproche de celle du plasma sanguin. La mamelle lésée se comporte comme un organe d'élimination : il y a donc une diminution des molécules élaborées (lactose, caséines, lipides) et une augmentation des molécules filtrées (protéines solubles : immunoglobulines et albumines sérique, matières minérales) (**Brouillet, 199 ; Hanzen, 2009**).

1.4.2. Facteurs d'environnement

1.4.2.1. Facteurs alimentaires

La maîtrise de certains facteurs tels que l'alimentation est très intéressante puisqu'elle peut permettre à l'éleveur d'agir sur la composition du lait et améliorer ses caractéristiques (**Pougheon, 2001**). En pratique et à petite échelle, on constate que les variations des taux d'une exploitation à l'autre sont principalement attribuables à des facteurs du milieu (alimentation, traite). Une réduction courte et brutale du niveau d'alimentation se traduit par une baisse variable du taux protéique (**Pougheon, 2001**). Selon **Alais (1984)**, la sous-alimentation entraîne une diminution de la quantité de lait et un amaigrissement de l'animal qui utilise les réserves corporelles pour la sécrétion de lait. La teneur en matière grasse ne diminue que s'il y a une réduction simultanée des apports énergétiques et azotés. La suralimentation provoque un accroissement de la production de lait qui est plus importante pour les vaches à potentialité élevée ; mais la composition de lait varie peu.

1.4.2.2. Facteurs liés aux conditions d'élevage (la traite)

A l'inverse de la matière grasse, le lait du début de traite tend à être plus riche en protéines que le lait de fin de traite. Le lait de fin de traite est ainsi 4 à 5 fois plus riche en matières grasses que le lait de début de traite suite à la meilleure libération des globules graisseux par les acini. L'intervalle entre deux traites a peu d'influence sur la concentration en protéines. En cas d'intervalles de traite inégaux, le meilleur taux butyrique sera obtenu après l'intervalle le plus court. La concentration en protéines du lait de la traite du soir est toujours plus importante (**Hanzen, 2009**).

1.4.2.3. Saison et climat

L'influence de la saison résulte des effets combinés de l'alimentation, des facteurs climatiques et du stade de lactation des vaches. On peut observer qu'après avoir augmenté passagèrement lors de la mise à l'herbe, les teneurs en matières grasses et azotée du lait diminuent pendant deux à trois mois jusqu'en juillet puis augmentent du mois d'août au mois d'octobre. Des écarts de 0.25 Kg de matières azotées /100 litres de lait ont été rapportés au Québec entre le mois de mai le plus faible et

le mois de novembre le plus élevé. La concentration en calcium est minimale en été et maximale au printemps. L'humidité de l'air ne semble exercer une action significativement négative sur la production laitière que lorsque la température est supérieure à 24°C. Aussi, Le vent n'exerce un effet négatif que lorsque la température est supérieure à 27°C (**Hanzen, 2009**).

1.5. Eléments biologiques du lait

1.5.1. Microorganismes

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml et moins de 1 coliforme/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire. Il peut s'agir par exemple d'agents de mammites (**Larpent, 1997 ; Guiraud, 1998**).

La flore microbienne des laits crus englobe différents types de micro-organismes :

❖ Bactéries

Parmi les micro-organismes rencontrés dans le lait, les bactéries sont ceux qui prédominent. Les bactéries sont des cellules de petite taille (quelques μm). Elles peuvent être sphériques (coques), en bâtonnet (bacilles) plus ou moins réguliers ou incurvés. Placées dans des conditions défavorables, certaines d'entre elles sont capables de donner naissance à des spores qui vont leur permettre de survivre. C'est le cas par exemple des butyriques (*Clostridium tyrobutyricum*) qui peuvent résister à des conditions hostiles de température grâce à la sporulation (**Hartheiser, 1994 ; Beuvier, 2005**).

❖ 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. Elles sont classées par genres et espèces et sont regroupées elles aussi au sein de famille selon leur morphologie et leur mode de reproduction. On compte notamment parmi elles *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae* (**Beuvier, 2005**).
- **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 (**Beuvier, 2005**). Les moisissures peuvent altérer certains produits destinés à l'homme ou à l'animal, en provoquant des changements d'aspects, en changeant les qualités organoleptiques (odeur, saveur) ou en modifiant des substances chimiques (**Dellaras, 2014**).

1.5.2. Facteurs affectant le développement des germes

Les bactéries, les levures et les moisissures ont des exigences nutritionnelles et physiologiques qui leur sont propres. De plus, au sein de chaque groupe, il existe des spécificités liées au genre, à l'espèce ou à la sous espèce concernés. Lorsqu'ils atteignent le lait, les micro-organismes doivent donc s'adapter d'une part aux caractéristiques de ce milieu (facteurs intrinsèques : pH du lait, la composition en nutriments, les systèmes antimicrobiens comme les bactériocines) mais aussi aux facteurs ambiants (extrinsèques : la température) auxquels le lait est soumis (**Beuvier, 2005**).

L'ensemble de ces paramètres sont eux-mêmes dépendants de facteurs amont liés à l'animal comme la race, le cycle de lactation, la génétique mais aussi aux conditions de production, en particulier l'alimentation et l'environnement (**Hanzen, 2009**).

1.5.3. Flore lactique

Ce sont des bactéries Gram(+) (coques ou bacilles) produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples ou oses (fermentation lactique). On distingue principalement : les lactocoques, les leuconostocs, les pédiocoques, les streptocoques thermophiles, les lactobacilles mésophiles et thermophiles et les entérocoques. Elles ont pour rôles essentiels d'acidifier le lait et le caillé, de participer à la formation du goût (protéolyse, production d'arômes), de la texture et de l'ouverture des produits laitiers (fromage, beurre, yaourt, lait fermenté). Ces bactéries sont maintenant largement utilisées sous formes de levains sélectionnés (**Bouise et Leveau, 1993 ; Bourgeois et Larpent, 1996 ; Beuvier, 2005**).

1.5.4. Contaminants du lait

1.5.4.1. Bactéries

Du fait même de sa composition et des conditions de production, le lait peut être contaminé par des microorganismes qui, en se multipliant dans le milieu, provoquent des transformations nuisibles à la qualité du lait par dégradation de ses constituants (protéines, lipides, lactose) et (ou) libération en leur sein de composés indésirables. Ces dégradations peuvent être dues à des bactéries, levures et moisissures et se traduisent par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (**Beuvier, 2005**).

❖ Flore aérobie mésophile (FAMT)

La flore microbienne totale quantifiée lors des analyses de lait sous le terme « germes totaux » représente une image de l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans l'échantillon de lait **(Beuvier, 2005)**.

IL s'agit de l'ensemble des micro-organismes capable de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre +20°C et +45°C. Ces micro-organismes sont aptes à donner naissance à des colonies visibles après trois jours d'incubation à 30°C.

En principe, une flore totale aérobie mésophile peut être considérée comme flore d'altération car la présence des micro-organismes indique un processus de dégradation en cours **(Bonfoh et al., 2004)**.

La non-conformité de la flore aérobie à 30°C est signe d'un manque d'hygiène, d'un traitement thermique insuffisant ou à des conditions de conservations défectueuses **(Dellaras, 2014)**.

❖ Coliformes

En microbiologie alimentaire, on appelle « coliforme » les entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Ce sont des bacilles, Gram négatif non sporulant, aéro-anaérobies facultatif, ne possédant pas d'oxydase, capable de se multiplier en présence de sels biliaires **(Dellaras, 2014)**. Les coliformes thermo tolérant ou « coliformes fécaux », sont capables de se développer à 44°C. Cette flore est plus spécifique de la contamination fécale que les coliformes totaux **(Guiraud, 1998)**.

L'espèce *E. coli*, généralement mobile réalise une fermentation acide mixte avec production de l'indole **(Joly et Reynaud, 2003)**.

La flore coliforme est banale dans le lait cru. Dans les élevages, les déjections des bovins constituent le principal réservoir de ces bactéries, en particulier de l'espèce *E. coli*. Les laits produits dans de bonnes conditions d'hygiène et correctement réfrigérés contiennent généralement moins de 50 coliformes/ml **(Heuchel et Meffe, 2000)**.

❖ *Staphylococcus aureus*

Les *S. aureus* appartiennent au genre *Staphylococcus*, de famille micrococcaceae, sont des cocci à Gram positif, en générale aéro-anaérobies facultatifs, coagulase positif, catalase positif, non sporulé, immobiles et se divisent en plusieurs plans en formant des amas irréguliers **(Bourgeois, 1996 ; Guiraud, 1998 ; Cauty et Perreau, 2003)**.

Les infections mammaires à *S. aureus* constituent la principale source de contamination du lait à la production. Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites sub-cliniques

et chroniques chez la vache laitière, et d'environ un tiers des mammites cliniques (**Heuchel et Meffe, 2000**). Les *S. aureus* colonisent facilement les lésions cutanées du trayon de même que le canal du trayon et atteint éventuellement la glande mammaire. L'organisme peut aussi survivre ailleurs dans la vache hôte. La mammite à *S. aureus* est plus dommageable pour les tissus lactifères et entraîne une réduction de la production de l'ordre de 15% par vache infectée (**Durel et al., 2010**).

❖ Streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont des streptocoques du groupe D, cocci ovoïdes à Gram positif, disposé en courtes chainettes, catalase négatif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs. Ce sont des bactéries ubiquistes, d'origines fécales et moins souvent associées aux germes pathogènes que les coliformes fécaux (**Bourgeois et al., 1990**).

❖ Clostridiiums

Ce sont des bacilles à Gram positif, anaérobies strictes, capable de sporuler, réduisant les sulfites en sulfure. Ils sont essentiellement d'origine tellurique et le cycle de contamination ensilages /matières fécales /lait a été bien démontré (**Sutra et al., 1998 ; Dellaras, 2014**).

Les Clostridiiums peuvent contaminer le lait au moment de la traite. Il existe quelques espèces qui sont responsables d'intoxication ou gastro-entérites telles que *Clostridium perfringens* ou de graves intoxications souvent mortelles : *Clostridium botulinum* (**Bourgeois et al., 1996**).

❖ Salmonelles

Les bactéries de genre *Salmonella* appartiennent à la famille des entérobacteriaceae, bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature peritriche ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs (**Bourgeois et al., 1996**). Les salmonelles survivent très bien aux basses températures (réfrigération, congélation) mais sont relativement sensibles à la chaleur et sont détruites par la pasteurisation (**Sutra et al., 1998**). Le genre *Salmonella* conserve une importance considérable pour l'industrie vétérinaire et agro-alimentaire de par le monde, tant par la maladie provoquée chez l'animal que par l'association très étroite avec les toxi-infections alimentaires chez l'homme en raison de leur fréquence et de la gravité des symptômes, elles sont également à l'origine des typhoïdes et des paratyphoïdes (**Moll et Moll, 1995**).

1.5.4.2. Les antibiotiques

Les animaux, tout comme les humains, ont besoin des antibiotiques (ATB) et autres agents antimicrobiens pour prévenir ou traiter les maladies qui les affectent. L'usage de ces produits améliore leur santé. Or, la controverse entourant leur utilisation en agriculture provient surtout de l'usage intensif et non thérapeutique d'ATB à titre de facteurs de croissance qui peut conduire à l'apparition de résistance (**Scholl, 2009**).

Les ATB que l'on trouve dans le lait cru sont le plus souvent des résidus de traitement de la mammite par les médicaments vétérinaires voir des produits antiparasitaire ou phytosanitaire dans la ferme. La présence des ATB dans le lait pose deux sortes de problèmes. En premier lieu, ces résidus créent des difficultés au cours de la fabrication des produits qui nécessitent un caillage. Le principal danger réside cependant dans les réactions nuisibles chez les personnes hypersensibilisés à la pénicilline ou d'autres ATB. De plus le consommateur de lait cru peut se trouver exposé à des agents pathogènes provenant du pis et résistant aux ATB (**FAO, 1966**).

1.6. Qualité et modalité de paiement du lait cru

La qualité du lait a une résonance bien particulière et différente selon qu'on s'adresse à un groupe de producteurs, de transformateurs ou de consommateurs.

Malgré toutes les nuances qu'on voudra bien apporter à la notion de qualité du lait, personne ne contestera que la notion d'innocuité demeure centrale. Si l'on accepte de définir l'innocuité au sens large comme « qualité ou caractère d'une chose qui n'est pas nuisible, toxique ou nocive », l'innocuité du lait fait alors référence au fait qu'il ne rendra pas le consommateur malade. La présence de micro-organismes pathogènes, de résidus d'antibiotiques, de divers résidus chimiques associés au nettoyage ou à l'assainissement, représente les principales craintes des consommateurs et des transformateurs de lait (**Grenon et al., 2004**).

Le paiement du lait a la qualité repose sur plusieurs critères, tant sur sa composition (matière grasse et protéines) que sur certains éléments d'appréciation de la qualité (germes, cellules et résidus).

- la teneur en germes totaux : le premier critère du paiement du lait à la qualité appliquée est la teneur en germes totaux qui indique le niveau global de l'hygiène (**Hanzen, 1999**).
- teneurs en cellules somatiques : la teneur en cellules somatiques du lait est dans de nombreux pays un élément d'appréciation de la qualité du lait (**Badinand, 1994**).
- teneurs en résidus inhibiteurs : le lait cru peut contenir divers substances antibactériennes qui selon leurs concentrations, peuvent avoir une action inhibitrice sur la microflore de

contamination mais aussi sur les bactéries lactiques, leur action se manifeste par un retard et même un blocage complet de l'acidification au cours du processus de transformation du lait (Luquet, 1986).

1.7. Impacts économiques et sanitaires de la qualité du lait cru

La contamination du lait par les germes pathogènes et les résidus d'ATB engendre des conséquences certaines sur la santé humaine ainsi que sur la santé animale.

La consommation du lait contaminé peut avoir un effet immédiat, c'est-à-dire une toxi-infection comme il est possible d'avoir d'autres symptômes et d'autres conséquences selon la nature de germe responsable. Les toxi-infections sont les effets immédiats de l'infection aiguë. Certaines toxi-infections alimentaires entraînent également des séquelles à long terme, avec des conséquences graves sur la santé humaine et une incidence économique considérable (Mc Dowell et Mc Elvaine, 1997). Aussi, La présence des résidus d'ATB dans le lait peut constituer un risque pour la santé humaine par l'augmentation de l'antibiorésistance, la toxicité et les phénomènes d'allergie (Kroon, 2005 ; Caratolli, 2001 ; Mc Ewen, 1997 ; Mathieu, 1998).

Chapitre 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. Zone d'étude et échantillonnage

Le présent travail a ciblé l'étude de la qualité du lait de vache commercialisé dans différentes communes de la wilaya de Blida. Au total, 54 échantillons de lait cru issus du circuit de vente directe (crémeries) ont été analysés. Le lait de ce circuit est destiné pour la consommation humaine ou encore pour la transformation en petit-lait, lait caillé et beurre. Les communes qui ont été inclus dans cette étude sont : Affroune, Beni Mered, Blida, Boufarik, Chiffa, Guerouaou, Larbaa, Mouzai, Ouled Yaich et Soumaa.

Ainsi, il est à signaler que les analyses microbiologiques de la présente étude ont été réalisées au niveau de Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida. La recherche des antibiotiques a été réalisée au niveau de Centre de collecte Blida Danone (Maison des éleveurs de Blida).

La période expérimentale s'est étalée de Juillet à fin de Septembre 2014. Les échantillons, ainsi prélevé (quantité de 1 litre), sont transportés dans des flacons en plastiques directement au laboratoire dans les meilleurs délais dans une glacière étanche et hermétique (à +4°C).

2.2. Matériels

Le matériel de laboratoire employé dans ce travail est donné en Annexe 1.

2.3. Méthodes

2.3.1. Analyses microbiologiques

D'une façon générale le contrôle microbiologique garanti une certaine sécurité hygiénique et un certain niveau organoleptique, dans la mesure où ils dépendent des microorganismes (**Bourgeois et leveau, 1991**). Dans notre travail, trois objectifs ont été visés lors de ce contrôle :

- Recherche des germes capables d'altérer la qualité marchande de l'aliment (Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)).
- Recherche des germes potentiellement pathogènes pour le consommateur (salmonelles et staphylocoques à coagulase positive).
- Recherche des germes de contamination fécale (coliformes et streptocoques fécaux).

2.3.1.1. Techniques d'analyse et préparation des dilutions

Toutes les manipulations ont été réalisées stérilement et avec le maximum de précaution et de précision. La dispersion des cellules bactérienne est assurée par le TSE comme diluant. Après répartition de 9 ml de diluant dans des tubes à vis préalablement stérilisés (**Figure 2.1**), 1 ml de la solution mère (lait cru), convenablement homogénéisée, est introduit dans le premier tube pour obtenir ainsi une dilution à 1/10 ou 10^{-1} . Un volume de 1 ml est prélevé de la première dilution pour être complété par 9 ml du diluant pour obtenir une dilution de 1/100 ou 10^{-2} . L'opération est reproduite pour les différentes dilutions successives.



Figure 2.1: Préparation des dilutions décimales (**Originale, 2014**).

2.3.1.2. Recherche et dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile Totale (FTAM)

❖ Technique

Dans ce type de méthodes, les bactéries maintenues dispersées à la surface d'un milieu solide, donnent naissance, dans des conditions favorable, à des colonies isolées les une des autres qui, de ce fait, peuvent être directement comptées. En pratique, 1 ml de chaque dilution, bien homogénéisée, est prélevé et introduit dans une boîte de Pétri en le déposant au centre ou en le répartissant en gouttes au fond de la boîte. La gélose PCA (**Tableau 2.1**), préalablement liquéfiée et ramenée à 45°C en surfusion, est ensuite coulée aseptiquement dans la boîte. Nous procédons alors à une homogénéisation en imprimant à la boîte des mouvements circulaires. Après solidification sur paille, nous ajoutons une deuxième couche de la même gélose. Cette double couche a un rôle protecteur contre les contaminations diverses.

Tableau 2.1 : Caractéristique, milieux sélectifs et objectif de la recherche de la FAMT (Beuvier, 2005).

Germe	Caractéristiques	But de la recherche	Milieux sélectifs
FAMT	Microorganismes capables de se multiplier en aérobiose, à des températures optimales de croissance comprises entre 20 et 40°C.	Le dénombrement reflète, pour un produit, la qualité globale, l'hygiène générale et les conditions de stockage et de distribution.	Gélose PCA

❖ Incubation, lecture et dénombrement

Les boîtes sont incubées couvercle en bas à 30°C pendant 72h. Les colonies se présentent sous forme lenticulaire en masse. Les boîtes sont examinées, et on choisit celles contenant entre 15 et 300 colonies. Le nombre obtenu pour chaque boîte est multiplié par l'inverse de la dilution correspondante. Le résultat final de dénombrement est interprété en faisant une moyenne arithmétique des colonies comptées entre les différentes dilutions.

2.3.1.3. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et thermo-tolérants

❖ Technique

La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs (**Tableau 2.2**), à savoir :

- test de présomption, réservé à la recherche des coliformes totaux (**Figure 2.2**).
- test de confirmation, appelé encore test de Mac Kenzie, réservé à la recherche des coliformes fécaux à partir des tubes positifs du test de présomption.

❖ Test de présomption

Les dilutions choisies sont 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .

La technique NPP consiste à préparer dans un portoir une série de 9 tubes contenant le milieu (VBL) avec une cloche de Durham à raison de trois tubes pour chaque dilution. Alors, 1ml de chaque dilution décimale 10^{-1} à 10^{-3} , est transféré aseptiquement dans chacun des trois tubes. En prenant soin de chasser le gaz présent éventuellement dans les cloches de Durham en mélangeant le milieu et l'inoculum.

Tableau 2.2 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de la recherche des coliformes Totaux (CT) et coliformes fécaux (CF) ou thermo-tolérants (Guiraud, 1998).

Caractéristiques	But de la recherche	Milieux
<p>CT : Entérobactéries Gram-, oxydase -, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, fermentation de lactose à 30°C avec production de gaz et d'acide lactique.</p> <p>CF : croissance associée à une production d'indole à partir du tryptophane à 44°C.</p>	<p>L'intérêt est de déterminer pour le produit testé une contamination fécale récente et d'en apprécier l'ampleur, car les coliformes sont des bactéries vivants principalement dans les intestins et en abondance dans les matières fécales des animaux et de ce fait, constituent des indicateurs fécaux de la première importance.</p>	<p>Bouillon VBL (vert brillant et la bile)</p>

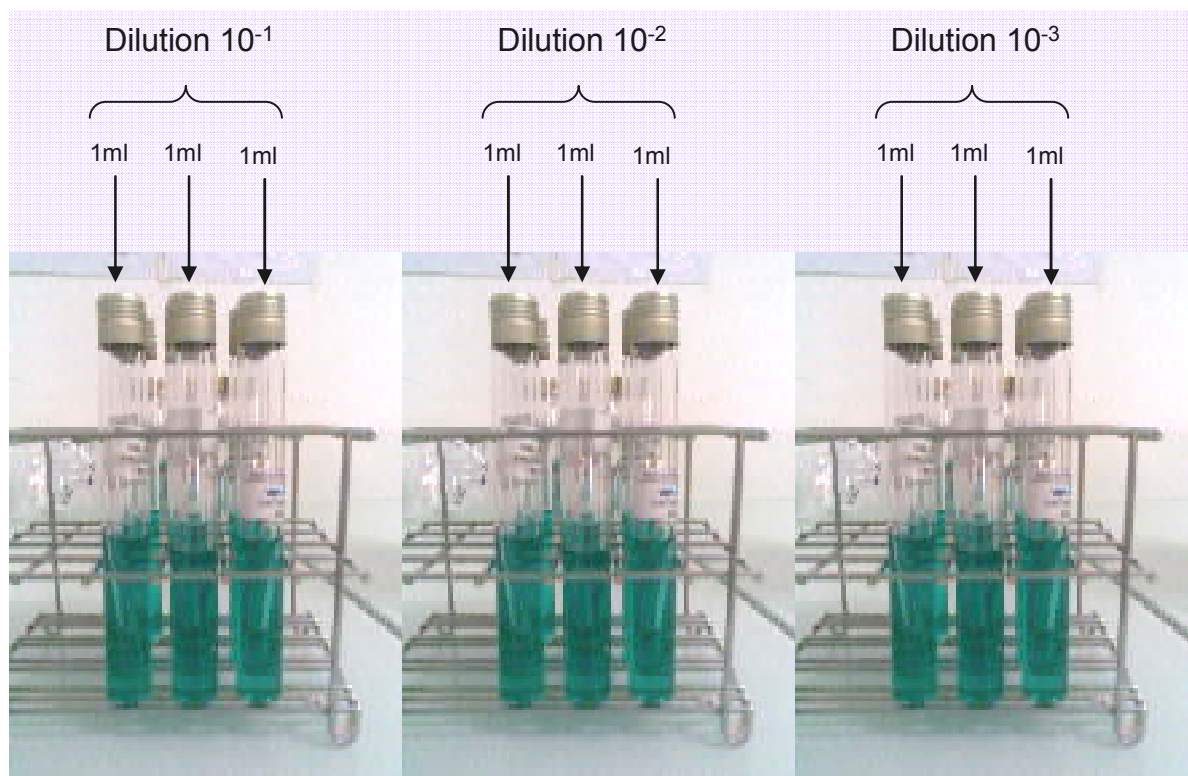


Figure 2.2 : Bouillon VBL pour le dénombrement des coliformes (Test de présomption).

❖ Incubation, lecture et dénombrement

Le dénombrement des coliformes totaux se fait selon la méthode du nombre le plus probable (NPP) en utilisant la table de Mac Grady. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes positifs sont ceux qui présentent à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10^{ème} de la hauteur de la cloche).
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune.

Test de confirmation ou test de Mac Kenzie

Les tubes de (VBL) positifs, trouvés lors du dénombrement des coliformes totaux, feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une pipette stérile dans deux autres tubes l'un contenant le milieu (VBL) avec cloche et l'autre de l'eau peptonée exempte d'indole (EPEI).

❖ Incubation, lecture et dénombrement

Les tubes sont maintenus à l'étuve à 44°C pendant 24 heures. Le résultat est considéré comme positif, seulement s'il y a un virage du (VBL) au jaune avec dégagement de gaz, au moins 1/10^{ème} de la cloche de Durham, et formation d'un anneau rouge après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs au tube de l'eau peptonée exempte d'indole (EPI).

2.3.1.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

❖ Technique

Les dilutions choisies sont 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³. La technique NPP consiste à préparer dans un portoir une série de 9 tubes contenant 10 ml de milieu Rothe s/c à raison de trois tubes pour chaque dilution. Alors, 1 ml de chaque dilution décimale 10⁻¹ à 10⁻³, est transféré aseptiquement dans chacun des trois tubes en prenant soin d'homogénéiser l'inoculum avec le milieu (**Figure 2.3**).

Tableau 2.3 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche des streptocoques fécaux
(Bourgeois *et al.*, 1990)

Caractéristiques	But de la recherche	Milieux sélectifs
Cocci gram+, chaînettes, Catalase négative et possédant l'antigène de groupe D.	Sa présence est un signe de contamination fécale récente. Leur présence dans les produits laitiers indique une déféctuosité du traitement thermique, de la technologie.	Milieu de présomption: Rothe, contient de l'azohydrate de sodium/ Milieu de confirmation: Litsky, contient de l'azohydrate de sodium et de l'éthyl violet.

❖ Incubation et Lecture

L'incubation des tubes est faite à 37°C pendant 24 à 48h. Les tubes présentant un trouble microbien après incubation, sont considérés comme positifs.

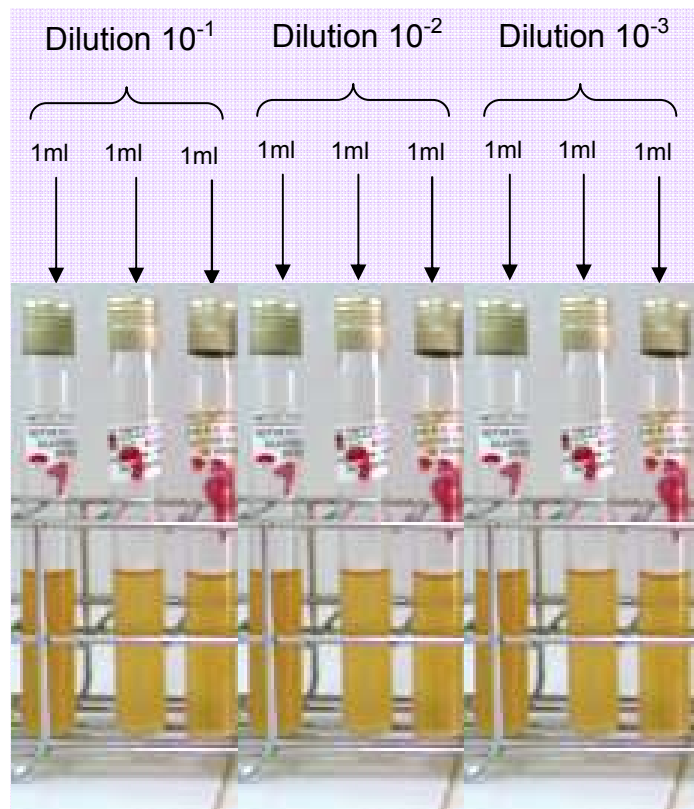


Figure 2.3 : repiquage des streptocoques fécaux dans le milieu Rothe (Test de présomption).

Test de confirmation

A partir des tubes positifs, un repiquage est procédé en transférant, à l'aide d'une pipette stérile, 3 à 4 gouttes vers un tube contenant le milieu Eva Litsky.

❖ Incubation, lecture et dénombrement

L'incubation des tubes est effectuée à 37°C pendant 24h. Les tubes présentant une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube avec un trouble microbien ; sont considérés comme positifs, donc présence de Streptocoque fécaux.

2.3.1.5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

❖ Enrichissement

A partir des dilutions 10^{-1} à 10^{-3} , on porte 1ml dans des tubes stériles numérotés. Dès lors, 15ml de milieu Giolitti Contoni, additionné d'une ampoule de Tellurite de potassium juste avant son utilisation, sont ajoutés aux tubes et on procède à l'homogénéisation du milieu avec l'inoculum.

❖ Incubation et lecture

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes positifs sont ceux qui présentent un noircissement, suite à la réduction du Tellurite de potassium .

Tableau 2.4 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche des *S. aureus* (Cauty et Perreau, 2003).

Caractéristiques	But de la recherche	Milieux sélectifs
Cocci à gram+, non sporulés, en amas irréguliers. Catalase +, aéro-anaérobies facultatifs. coagulase+.	Infections mammaires à <i>S. aureus</i> constituent la principale source de contamination du lait à la production.	Milieu d'enrichissement : bouillon de Giolitti Cantoni qui permet une meilleure revivification des souches Milieu d'isolement : Chapman qui a un pouvoir inhibiteur obtenu par une forte concentration de Nacl 7,5%.

❖ Isolement

L'isolement se fait à partir des tubes positifs sur gélose Chapman (préalablement coulée, solidifiée, refroidie et convenablement séchée en boîtes de Pétri) par ensemencement en stries.

❖ Incubation et lecture

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies des staphylocoques sont petites, lisses, légèrement bombées jaunes (figure).

❖ Identification de *Staphylococcus aureus*

Les deux tests réalisés pour identifier les *Staphylococcus aureus* sont : la catalase et la coagulase libre.

❖ Recherche de la catalase

La mise en évidence de cette enzyme, qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène, peut être réalisée à partir d'une seule colonie sur milieu gélosé. La technique consiste à placer séparément deux gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame de microscope. Puis, on prélève une colonie, préalablement sélectionnée sur gélose Chapman, au moyen d'une baguette en verre stérile que l'on émulsionne doucement dans une des deux gouttes. La formation de bulles d'oxygène indique une réaction positive (Larpent, 1997).

❖ Recherche de la coagulase libre

A partir des colonies catalase positive, nous préparons une suspension bactérienne, en ajoutant une ou deux colonies au milieu cœur cerveau contenu dans des tubes à vis. Le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, 0,5ml de plasma de lapin est mélangé avec 0,5ml de cette suspension bactérienne. Le mélange final est incubé à 37°C pendant 4h. Les tubes contenant un coagulum sont considérés comme positifs et les colonies comme étant des *Staphylococcus aureus*.

2.3.1.6. Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs

❖ Technique

Les contenants 1ml des dilutions 10^{-1} à 10^{-2} (dans des tubes en verre) sont soumis à un chauffage, dans un bain mari (figure 2.7.), à 80°C pendant 10min, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet. Le chauffage suivi d'un refroidissement brutal (ou trempage) a pour but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.

Tableau 2.5 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche des *Clostridium* sulfito réducteurs (Guiraud, 1998).

Caractéristiques	But de la recherche	Milieux sélectifs
Bacilles à gram positif, anaérobies stricts, mobiles par ciliature péritriche, mais parfois immobiles et capsulés, possèdent des spores résistant au moins 10 min à 80°C, et sont capables de réduire les sulfites en sulfure par la sulfito-réductase.	Les <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs (ou leurs spores), sont considérées comme indice de contamination fécale, ancienne résistance des spores à l'extérieur.	Gélose Viande-Foie (VF), additionnée de deux additifs : Alun de fer (contenant le fer III comme indicateur de les sulfites de sodium).

Ainsi, 15ml de la gélose VF (fondue au préalable et maintenue en surfusion à 45°C), supplémentée d'une ampoule de sulfite de sodium (5%) et d'une autre d'alun de fer, sont ajoutés aux tubes contenant les produits traités (dilutions).

❖ Incubation, lecture et dénombrement

Les tubes sont alors laissés solidifier, puis incubés à 37°C pendant 24 à 48heures avec une première lecture à 16 heures. Les colonies de *Clostridium* sulfito-réducteurs, sont des colonies noires d'un diamètre supérieur à 0,5mm. Le noircissement est dû à la réduction de sulfite en sulfure qui

précipite avec les ions de fer. Les résultats sont exprimés en nombre de spores d'anaérobie sulfite-réducteurs par ml de produit analysé (on prend en considération le facteur de dilution).

2.3.1.7. Recherche des salmonelles

Quel que soit la denrée alimentaire soumise à la recherche de *Salmonella*, une prise d'essai particulière est nécessaire, car cette recherche se fait sur 25 g de produit solide ou 25 ml de produit liquide.

❖ Pré-enrichissement

Le pré enrichissement s'effectue, dans un flacon stérile, en mélangeant 25ml de lait cru avec 225ml de milieu TSE (Tryptone Sel Eau). L'incubation sera maintenue à 37°C pendant 18 à 24heures.

❖ Enrichissement primaire

Ce dernier consiste à mélanger 10ml de milieu de pré-enrichissement avec 100ml de bouillon Sélinite-Cystéiné (Flacon SFB supplémentée avec son additif). L'incubation est faite à 37°C pendant 18 à 24heures. Le contenu du flacon vire en rouge brique en présence de salmonelles.

❖ Enrichissement secondaire et isolement

Le bouillon Sélinite-Cystéine (Tableau 2.6) incubé la veille coloré en rouge brique fera l'objet :

- d'une part, d'un enrichissement secondaire sur bouillon Sélinite-Cystéine en tube de 10ml à raison de 0,1ml par tube ;
- d'autre part, d'un isolement sur gélose Hektoen (H1).

Dans les deux cas, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

Tableau 2.6 : Caractéristiques, milieux sélectifs et but de recherche de salmonelles
(Guiraud, 1998).

Caractéristiques	But de la recherche	Milieux sélectifs
bactéries pathogènes, bacilles, gram négatif, elles sont mobiles grâce à une ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase-, catalase+, nitrate réductase+.	Leur recherche et leur identification permettent de montrer le danger possible d'un produit. Sa présence dans les produits laitiers provoque de très graves toxi-infections.	Pré-enrichissement et enrichissement: SFB (Sélénite-Cystéine) Milieu d'isolement sélectif : gélose Hektoen.

❖ Lecture et identification

D'une part, le bouillon Sélinte-Cystéine fera l'objet :

- d'un isolement sur gélose Hektoen (H2) ;
- d'autre part, la boîte de gélose Hektoen (H1) subira une lecture en tenant compte du fait que *Salmonella* se présentent sous forme de colonies de couleur grise bleutée à centre noir.

Il est indispensable que toutes les colonies caractéristiques doivent faire l'objet d'une identification biochimique. L'absence des colonies de salmonelles, ainsi que l'absence du virage de coloration du milieu d'enrichissement secondaire indiquent l'absence des salmonelles dans le lait analysé.

2.3.2. Recherche des résidus d'antibiotiques

Dans ce travail, les 54 échantillons collectés, de différentes localités de la région de Blida, ont fait l'objet d'un contrôle de la fréquence de contamination par les molécules inhibitrices susceptibles d'être présentes dans le lait cru. Pour ce fait, la technique adoptée est celle dite : méthode par le Delvotest SP - NT.

2.3.2.1- Kit d'analyse de Delvotest SP-NT

Delvotest SP-NT (**Figure 2.4**) est un test permettant de détecter dans le lait la présence de substances antibactériennes telles que les antibiotiques et les sulfamides.



Figure 2.4 : Coffret de Delvotest SP-NT.

Le coffret de Delvotest SP-NT contient 100 ampoules avec une gélose ensemencée par un nombre standardisé de spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, des nutriments pour ce micro-organisme et du pourpre de bromocrésol. Le coffret contient aussi une seringue doseuse avec 100 embouts jetables pour prélever les échantillons.

Le Delvotest SP est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de détecter les résidus de substances anti-infectieuses dans le lait. L'utilisation de ce test permet de détecter au niveau des MRL (Maximum Residue Limit) un certain nombre de substances reprises dans la liste de MRL définies pour le lait dans la législation européenne. L'utilisation du Devotest SP n'exclut pas que pour certaines molécules utilisées dans des médicaments vétérinaires, leurs résidus peuvent être présents dans le lait à des teneurs supérieures aux MRL, sans pour autant y être détectées, c'est le cas de certaines substances interdites comme le chloramphénicol ou les nitrofuranes (**Titouche et al., 2013**).

❖ Principe du test

Un échantillon de lait est laissé à diffuser dans un milieu gélosé contenant des substances nutritives, un indicateur de pH et du triméthoprime, ensemencé par des spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Après incubation, la croissance normale du micro-organisme et la production d'acide qui en résulte provoquent le virage de couleur de l'indicateur de pH du pourpre (violet) vers le jaune. En présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu gélosé reste pourpre (violet) après la période d'incubation prescrite (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009 ; Mensah et al., 2014**).

❖ Précautions à prendre

Ce test étant extrêmement sensible aux substances antibactériennes, il est nécessaire d'éviter tout risque de contamination par de telles substances. Il est recommandé de se laver et se sécher correctement les mains avant l'analyse, de travailler sur une surface propre, de manipuler les ampoules avec délicatesse afin de ne pas décoller le milieu gélosé. Ceci affecterait la qualité de la couleur du test lors de la lecture des résultats.

❖ Mode opératoire

La technique consiste à découper le nombre d'ampoules nécessaire avec une paire de ciseaux ou un cutter en faisant attention de ne pas endommager la feuille d'aluminium couvrant les ampoules adjacentes (Ne pas arracher les ampoules). Pareillement, 0,1 ml de chaque échantillon de lait à tester est prélevé, au moyen d'une seringue à embout de pipette jetable neuf, et introduit dans l'ampoule correspondante (préalablement étiquetée ou numérotée) en tenant soin de verser la

totalité de l'échantillon prélevé (pour cela, presser lentement sur le piston pour ajouter la totalité du lait sur la gélose) (**Figure 2.5**).



Figure 2.5 : Etapes à suivre en appliquant le Delvotest SP-NT.

❖ Incubation

Les ampoules sont incubées dans les puits de l'incubateur à $64^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 3 heures. Il est à noter que des températures trop hautes, trop basses, ou variables durant l'incubation affecteront la durée de test et pourront diminuer sa sensibilité (**Figure 2.6**).



Figure 2.6: Incubation des ampoules (**Originale, 2014**).

❖ Lecture

La lecture des résultats (**Figures 2.7 et 2.8**) est faite après les 3 heures d'incubation (à 64°C). Les résultats doivent être lus dans les 2/3 inférieurs de l'agar. Ainsi :

- Une couleur jaune indique l'absence de substance antibactérienne à une concentration inférieure ou égale à la limite de détection du test.
- Une couleur jaune / violette indique la présence de substances antibactériennes dans l'échantillon de lait analysé à un taux proche du seuil de détection.
- Une couleur violette indique la présence de substances antibactériennes dans l'échantillon de lait analysé à un taux égal ou supérieur au seuil de détection.



Figure 2.7 : interprétation des résultats Delvotest SP-NT.



Figure 2.8: Résultats des analyses par Delvotest (Originale, 2014).

Le seuil de détection du Delvotest SP-NT se situe entre 2 et 3ng/ml pour la pénicilline G et entre 100 et 150ng/ml pour la sulfadiazine. Les sulfamides et d'autres substances bactériostatiques peuvent donner un violet moins intense.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats des analyses bactériologiques

La maîtrise de la contamination de lait par les bactéries pathogènes, en particulier celles réglementées par différentes institutions nationale et internationale (**Tableau 3.1**), est aujourd'hui la préoccupation majeure des filières des produits à base de lait cru. L'objectif de notre travail consiste à rechercher et dénombrer les germes indicateur de qualité hygiénique ainsi que ceux responsables de toxi-infections alimentaires dans le lait de vache cru commercialisé dans la wilaya de Blida. Aussi, une étude toxicologique a été entamée dans ce travail via la recherche des résidus d'ATB pouvant être présent dans cette denrée alimentaire.

Tableau 3.1 : Normes microbiologiques du lait de vache cru selon le Journal Officiel de la République Algérienne (**JORA, 1998**)

Germes	Normes
Flore Totale Aérobie Mésophiles (FAMT)	10^5
Coliformes fécaux	10^3
Streptocoques fécaux	Absence /0.1 ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	absence
Clostridium sulfito-réducteurs a 46°C	50
Antibiotiques	Absence

3.1.1. Recherche et dénombrement de Flore Aérobie Mésophiles Totale

Dans l'analyse microbiologique, les germes totaux constituent les premiers paramètres à prendre en considération dans un contrôle bactériologique des laits crus. Ils constituent un indice sensible et pratique dans l'évaluation de la qualité globale du lait. Elle est considérée comme le facteur déterminant la durée de conservation du lait frais (**Guillet *et al.*, 2002 ; Leyral et Vierling, 2007 ; Delarras, 2014**). C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques. L'énumération de cette flore pour les 54 échantillons a montré qu'il y a une contamination importante du lait cru commercialisé dans la wilaya de Blida. Les résultats relatifs au dénombrement de la flore totale sont représentés par le **Tableau 3.2**.

Tableau 3.2: Résultats du dénombrement de la Flore Totale Aérobie Mésophile.

Communes	Nombre échantillon	Nombre prélèvements contaminés	%
Affroune	07	02	28.57
Beni Mered	06	04	66.66
Blida	04	02	50
Boufarik	07	05	71.42
Chiffa	03	03	100
Guerouaou	03	00	00
Larbaa	03	02	66.6
Mouzaia	03	01	33.33
Ouled Yaich	12	09	75
Soumaa	06	05	83.33
Total	54	33	61.11

D'après les résultats obtenus, il apparaît clairement une variation dans le nombre de germes totaux en fonction des lieux de prélèvements et qui dépasse, dans certaines communes, les normes microbiologiques fixées dans le JORA.

Par ailleurs, la plus importante contamination est relevée dans le mois de Juillet (atteignant une moyenne de $45.6 \cdot 10^5$ UFC/ml), suivie par celle mesurée dans le mois d'Aout ($44.5 \cdot 10^5$ UFC/ml) puis par celle relevée dans le mois de Septembre ($39.61 \cdot 10^5$ UFC/ml) (Annexe 2).

De plus, l'exploitation des résultats obtenus a permis de conclure que les plus fortes contaminations sont celles observées dans la région de Chiffa (avec un pourcentage de 100%) suivie par celles de la région de Soumaa (83%). En revanche, pour les communes de Guerouaou et Affroune, la majorité des échantillons présentaient une qualité satisfaisante aux normes en vigueur (**JORA, 1998**).

La contamination par la FAMT est très importante car 61.11% des laits analysés montrent une flore supérieure à 10^5 UFC/ml. Cette situation est très inquiétante comparativement à celle rapportée aux Etats-Unis par **Boor et al. (1998)** et en France par **Raynaut (2005)** où seulement 5% et 2% respectivement des laits des élevages comportaient une flore supérieure à 10^5 UFC/ml. En revanche, une étude Algérienne (**Baazize, 2005**) a rapporté un taux de contamination très élevée, de l'ordre de 91.78%. Dans le même sillage, plusieurs études ont rapporté une contamination importante du lait par la FTAM, supérieure dans la majorité des cas à $2 \cdot 10^6$ UFC/ml. C'est le cas en particulier de **Arimi et al. (2000)**, au Kenya, où ils ont observé des taux de 86% et 88% à Nairobi et Nakuru, respectivement. **Mwangi et al. (2000)**, eux aussi, ont révélé un taux de 82% dans ce même pays.

En Algérie et dans le même sillage que nos résultats obtenus lors de cette étude, et d'après les conclusions rapportées dans le travail de **Ameur et al. (2012)**, le lait cru collecté présente un taux

de contamination microbienne (FTAM) très élevé (entre 10^5 et 10^7 UFC/ml), préjudiciable aussi bien à la transformation dans l'industrie laitière qu'à la santé publique. Nos résultats se situent dans cet intervalle de contamination, ils sont supérieurs aux résultats rapportés par **Aggad et al., (2009)** dans l'ouest Algérien.

Nos échantillons sont de mauvaise qualité au vu des normes algériennes qui fixent le seuil de contamination à 10^5 UFC/ml. Ils révèlent un manque de respect des bonnes pratiques de production et du stockage du lait de la traite du soir qui va ensuite être mélangé avec le lait de la traite du lendemain matin, et au niveau de la multitude des transvasements (**Amhourri et al., 2010**).

Bonfoh et al. (2002) au Mali, **Chye et al. (2004)** en Malaisie et **Farhan et Salik (2007)** au Pakistan ont fait le même constat sur des échantillons de lait analysés. Selon **Aumaitre (1999)**, la santé du troupeau laitier, la traite et les conditions de pré-stockage sont aussi des déterminants de base pour la qualité du lait. Les bactéries peuvent entrer dans le lait pendant qu'il est encore dans la mamelle et la plupart des microorganismes retrouvés dans le lait cru sont des contaminants provenant de la surface externe de la mamelle, des ustensiles de traite et les conditions de pré-stockage sont aussi des déterminants de base pour la qualité du lait. Dans le but de réduire la contamination du lait, les ustensiles utilisés lors de la traite doivent être rincés à l'eau propre, nettoyés avec un détergent et un désinfectant juste avant et après usage (**FAO et OMS, 2007**).

3.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux

Certaines bactéries ou groupes bactériens mis en évidence peuvent être considérés comme témoins de contamination d'origine fécale et indiquent la présence possible de germe pathogène. Parmi eux, nous avons les coliformes qui sont des entérobactéries qui fermentent le lactose avec production de gaz. Les résultats de dénombrement des coliformes totaux et thermo-tolérants sont consignés dans les **Tableaux 3.3 et 3.4**.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la totalité des échantillons analysés et provenant des régions de Chiffa et Boufarik sont de qualité non satisfaisante. De plus, le reste des échantillons analysés des autres régions sont aussi contaminés par cette flore indicatrice avec des taux variables. En fonction des mois de prélèvement, les variations moyennes peuvent être classées respectivement en allant de l'échantillon le plus contaminé vers le moins contaminé comme suit : Juillet (moyenne 1.12×10^3 UFC/ml), Septembre (moyenne 1.05×10^3 UFC/ml) puis Aout (moyenne 0.96×10^3 UFC/ml) (Annexe 2).

Tableau 3.3 : Résultats de la recherche et du dénombrement des coliformes totaux à 37°C.

Communes	Nombre échantillon	Nombre prélèvements contaminés	%
Affroune	07	02	28.57
Beni Mered	06	02	33.3
Blida	04	02	50
Boufarik	07	04	57.14
Chiffa	03	03	100
Guerouaou	03	01	33.33
Larbaa	03	01	33.3
Mouzaia	03	00	00
Ouled Yaich	12	06	50
Soumaa	06	01	16.6
Total	54	22	40.47

La recherche de microorganismes indicateurs de la contamination d'origine fécale permet de juger l'état hygiénique d'un produit. Même à des niveaux faibles, ils témoigneraient de conditions hygiéniques dégradées lors de la traite ou au cours du transport (Labioui et al., 2009). Leur présence est souvent associée à des entérobactéries pathogènes comme les *Salmonella*, les *Shigella*, les *Yersinia* et certains biotypes d'*E. coli* (Mhone et al., 2011).

Tableau 3.4 : Résultats de la recherche et dénombrement des coliformes thermo-tolérants à 44°C.

Communes	Nombre échantillon	Nombre prélèvements contaminés	%
Affroune	07	05	71.42
Beni Mered	06	03	50
Blida	04	02	50
Boufarik	07	07	100
Chiffa	03	03	100
Guerouaou	03	01	33.33
Larbaa	03	02	66.6
Mouzaia	03	02	66.6
Ouled Yaich	12	09	75
Soumaa	06	04	66.6
Total	54	38	70.37

D'après les résultats obtenus, 16 échantillons se relèvent conformes aux normes JORA et 38 échantillons de qualité non acceptable. La présence des coliformes thermo-tolérants dans les échantillons a été faite avec le test de confirmation en utilisant le réactif de Kowacs (Figure 3.1).



Figure 3.1: Recherche des coliformes thermo-tolérants après le test de confirmation (présence anneau rouge après ajout de réactif de Kowacs) (Originale, 2014).

Il en ressort, d'après les résultats obtenus, que la localité de Chiffa est celle qui a présenté la plus forte contamination par les coliformes thermo-tolérants avec un taux dépassant les normes JORA (100% d'échantillons analysés). Par ailleurs, nos résultats (70%) pour les coliformes fécaux sont largement supérieurs à ceux rapportés par **Baazize (2005)** qui sont de l'ordre de 17.80%. La traite manuelle augmente les possibilités de contamination du lait, en accroissant la surface de contact entre le lait et les microorganismes du milieu ambiant, surtout lorsque que ce dernier est souillé. **Ngabet Njassap (2001)**, dans son étude réalisée au Cameroun, a rapporté que 57% des laits sont contaminés par les coliformes. En revanche, **Dieng (2001)** n'a signalé que 19% de cas de contamination.

Dans les élevages, les déjections des bovins constituent le principal réservoir des coliformes, en particulier de l'espèce *E. coli* mais. En dehors de la source fécale, des mains des trayeurs et des ustensiles, la contamination du lait peut être due à l'excrétion mammaire en cas d'infection à *E. coli*. Les coliformes totaux, les coliformes fécaux et *Escherichia coli* ont été rencontrés dans les échantillons de lait analysés. L'existence des coliformes totaux n'indique pas nécessairement une contamination fécale directe du lait, mais elle est considérée comme un indicateur de mauvaises pratiques d'hygiène et sanitaire durant la traite et post manipulation (**Leyral et Vierling, 2007**).

Le contrôle impératif de ces laits après pasteurisation, s'impose vu la charge abondante en ces germes ; ils ne sont pas pathogènes, mais certains d'entre eux, notamment ceux appartenant à l'espèce *E. coli*, sont considérés comme responsables d'intoxications alimentaires (**Guillet et al., 2002 ; Leyral et Vierling, 2007 ; Delarras, 2014**). D'après **Magnusson et al. (2007)**, les litières fortement souillées contiennent plus de coliformes et la prévalence de mammites, dans ce cas, augmente, suggérant une contamination des trayons et du lait plus importante. D'autres sources de

contaminations sont également à considérer tel que les mauvaises conditions de transport et le manque d'hygiène pendant la traite.

Les coliformes du genre *Escherichia* sont les plus fréquents dans les excréments des vaches laitières. Ils contaminent le lait directement (par contact direct avec le pis), ou se multiplient lors d'un mauvais nettoyage dans les rinçures des ustensiles laitiers. Par ailleurs, **Srairi et Hamama (2006)**, ont démontré que les pratiques de tétée préalables à la traite, auraient pour incidence une chute de la contamination par les coliformes fécaux dans le lait, car les premiers jets de lait sont les plus fortement contaminés en microorganismes présumés pathogènes, surtout en cas de mammites. L'étude menée par **Beerens et Luquet (1987)** sur les mammites à *E.coli*, démontre que la composition protéique du lait est modifiée, notamment celle des caséines qui diminue de près de 21%. Ces changements affectent la transformation fromagère et la qualité des produits laitiers.

Il faut néanmoins instaurer une politique de qualité avec la vulgarisation des bonnes pratiques d'élevage et insister sur la propreté des animaux, de leur environnement immédiat et la salubrité de la traite.

3.1.4. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Les Streptocoques peuvent provenir de l'environnement, les canaux galactophores des vaches, équipements de traite et de stockage de lait (**Larpen, 1997**). La présence des Streptocoques fécaux est un signe de contamination fécale (**Guiraud, 2003**).

Tableau 3.5 : Résultats de la recherche et du dénombrement des streptocoques fécaux

Communes	Nombre Prélèvements	Nombre prélèvements positifs	%
Ouled yaich	12	09	75
Beni mered	06	04	66.66
Soumaa	06	03	50
Larbaa	03	0	0
Blida	04	03	75
Afroune	07	02	28.57
Mouzaya	03	01	33.3
Chefa	03	03	100
Boufarik	07	05	71.42
Guerouaou	03	0	00
Total	54	30	55.55

Le **Tableau 3.5** illustre les résultats de dénombrement des entérocoques du groupe D, en milieu liquide, par la méthode NPP. La présence des de ces germes indicateurs a été confirmée par la présence d'une pastille blanchâtre au fond du tube contenant le milieu Eva Litsky (**Figure 3.2**).



Figure 3.2 : Pastille blanchâtre au fond du tube Eva Litsky positif (**Originale, 2014**)

Les résultats obtenus, lors de cette analyse, suggère que 55.55% des échantillons analysés dépassent les normes en vigueur, indiquant la non-conformité du lait. Ainsi, les échantillons de qualité non satisfaisante sont ceux commercialisés dans les communes de Chiffa, Ouled Yaich et Blida avec, respectivement, un taux de 100%, 75% et 75%.

Des charges en streptocoques fécaux dépassant les normes ont été également observées par **Aggad et al. (2009)** dans des laits de mélange de l'ouest algérien. La moyenne des résultats de l'étude menée par **Labioui et al. (2009)** au Maroc est de 10^3 UFC/ml. Nos résultats sont également supérieurs à ceux rapportés par **Affif et al. (2008)** au Maroc 10^2 UFC/ml. En revanche, **Baazize (2005)** a rapporté un taux de 91%. Les entérocoques sont très répandus dans le milieu environnemental de l'animal mais ne sont que peu ou pas pathogènes.

Dans notre étude, la présence des streptocoques dans le lait (55%) semble être normale pour certains auteurs (**Beerens et Luquet, 1987 ; Baazize, 2005**) car ce taux, quoique considérable, ne reflète que les mauvaises conditions d'hygiène des exploitations. Toutefois, ces germes sont moins souvent associés aux germes pathogènes que les coliformes fécaux. Ils ne renferment pas d'espèce considérée pathogène du point de vue alimentaire. Cependant, après prolifération abondante dans l'aliment, ces germes peuvent être à l'origine de toxi-infections bénignes qui sont, toutefois, exceptionnelles (**Cuq, 2007**). La présence des *E. coli*, des Entérocoques fécaux dans le lait indique la présence possible de micro-organismes entéropathogènes et le risque de développer une gastroentérite (**Leyral et Vierling, 2007 ; Delarras, 2014**).

3.1.5. Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Les *S. aureus* contaminent fréquemment les aliments et peuvent entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires (Guiraud, 2003). Les quartiers de la mamelle déjà infectée ainsi que la peau du trayon peuvent contaminer le lait de la traite, du fait d'une mauvaise condition d'hygiène et de dysfonctionnement de la machine à la traite (Larpen, 1997).

Tableau 3.6 : Résultats et recherche de dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Communes	Nombre Prélèvements	Nombre prélèvements positifs	%
Affroune	07	07	100
Beni Mered	06	03	50
Blida	04	02	50
Boufarik	07	07	100
Chiffa	03	02	66.66
Guerouaou	03	03	100
Larbaa	03	02	66.66
Mouzaia	03	02	66.66
Ouled Yaich	12	08	66.66
Soumaa	06	04	66.66
Total	54	40	74.07

Les résultats obtenus (Tableau 3.6) révèlent que sur les 54 prélèvements du lait analysés, 14 échantillons présentaient une absence de staphylocoques, et par conséquent répondaient aux normes en vigueur. En revanche, 40 échantillons se sont révélés positifs avec une présence de *S. aureus* a coagulase positive dans 4 prélèvements. A noter que la présence de cette espèce pathogène a été confirmée par le noircissement du milieu Giolitti Cantoni suivi par un isolement sur milieu Chapman et un la recherche de la coagulase sur milieu (Figures 3.3 et 3.4).

Sur 19 échantillons analysés dans le mois de Juillet (Annexe), 11 échantillons sont trouvés positifs. Durant le mois d'Aout 9 échantillons sont trouvés positifs sur un total de 19 échantillons analysés. Alors qu'en Septembre, on relevait 9 échantillons positifs et 7 échantillons négatifs. D'après les résultats obtenus, il apparait clairement que la totalité des échantillons analysés et provenant des régions de Boufarik et Guerouaou se sont révélés positifs.

La contamination par *Staphylococcus aureus* au taux de 74% des échantillons de lait est inquiétante; ces résultats se rapprochant de ceux publiés par Baazize (2005). Ce germe pathogène constitue un risque réel pour la santé publique dans les produits transformés comme il peut produire, dans certaines conditions, des entérotoxines thermostables qui peuvent résister aux traitements thermiques.



Figure 3.3 : noircissement du milieu Giolitti Contonii après incubation (**Originale, 2014**).



Figure 3.4 : Colonies pigmentées sur gélose Chapman avec virage de milieu au jaune (**Originale, 2014**).

Les staphylocoques sont fréquemment retrouvés dans le lait et parfois en nombre important. L'origine de la contamination est la mamelle et plus fréquemment l'homme. Leur fréquence tend à augmenter du fait de leur antibiorésistance. Ils provoquent, par leur production de toxines thermostables, des intoxications de gravité variable pouvant être redoutables (**Mhone et al., 2011 ; Delarras, 2014**).

Les infections mammaires à *S. aureus* constituent la principale source de contamination du lait à la production. Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites. Les quantités de *S. aureus* excrétées dans le lait des quartiers infectés peuvent être considérables, de 10^3 à 10^5 bactéries/ml en moyenne, mais pouvant atteindre 10^8 bactéries/ml en cas d'infection clinique. De plus, la présence de germes considérés comme pathogènes est probablement dû à la mauvaise qualité hygiénique des récipients utilisés dans la filière (**Aggad et al., 2009**).

Etant donné son habitat et sa fréquente mise en cause dans les mammites, la présence des staphylocoques dans le lait paraît quasi inévitable. Les principales sources de contamination sont, en premier lieu la mamelle. Les infections mammaires à staphylocoques représentent la principale source de contamination du lait à la production, d'autres sources de contaminations sont également à considérer tel que la machine à traire, elle peut en effet infecter 6 vaches qui suivent la traite d'une vache infectée, et enfin l'homme (**Ben Hassen et al., 2003 ; Kouamé-Sina et al., 2010**).

Plus d'attention doit être donnée pour l'hygiène du lait, la santé mammaire ainsi qu'à la détermination et le contrôle des points critiques au niveau de la ferme pour prévenir les éruptions à staphylocoques.

3.1.6. Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito- réducteurs

Le constat général issu des analyses bactériologiques de la recherche des clostridiums est l'absence de ces derniers dans 51 échantillons. Sur les trois autres restants le nombre des clostridiums trouvé était inférieur à 50 UFC/ml. De point de vue qualité, les laits analysés peuvent être considérés de qualité satisfaisante par rapport à ce critère. A noter que les colonies présumés être appartenant aux spores anaerobies sulfito réducteurs apparaissent colorées en noir dans la masse de la gélose VF (**Figure 3.5**).

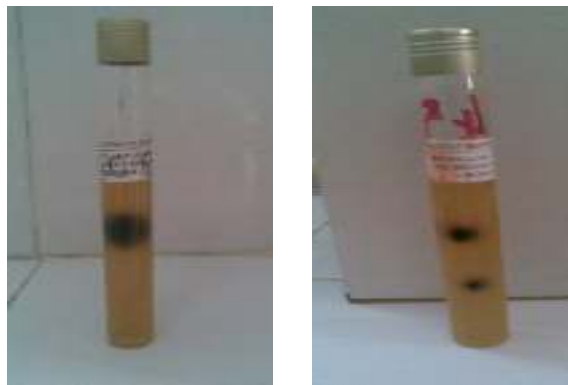


Figure 3.5 : Colonies noirs des spores du *Clostridium* sulfito-réducteurs dans la gélose Viande-Foie (**Originale, 2014**).

3.1.7. Recherche et dénombrement des *Salmonelles*

Les résultats de la recherche des salmonelles montrent l'absence totale de ce germe dans l'ensemble des échantillons de lait collectés et analysés. Nos résultats semblent être en accord avec ceux rapportés par **Mennane et al. (2007)**. Il indique que les espèces du genre *Salmonella* ne sont pas une menace pour les consommateurs de lait des localités prospectées. En général, l'isolement des salmonelles dans le lait cru est difficile à mettre en évidence (**Affif et al., 2008**).

En outre, une étude de l'institut de l'élevage français réalisée en (2000) a démontré que la prévalence de l'excrétion mammaire de salmonelles est d'environ 0.6%, faisant de cette voie une source de contamination rare mais pas exceptionnelle. La principale source de contamination serait l'excrétion fécale de salmonelles, dissémination de la bactérie dans l'environnement, puis contamination de la peau des mamelles et du matériel de traite et enfin passage dans le lait (**Affif et al., 2008**).

3.2. Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques (ATB)

Produit vivant et fragile, le lait doit répondre à des normes drastiques, afin d'assurer une qualité irréprochable tant sur le plan microbiologique que toxicologique. Un lait destiné à la consommation humaine se doit par conséquent être exempt de tout type de contamination et tout particulièrement médicamenteuse. Malheureusement, l'usage croissant et souvent irraisonné de produits ATB se solde très souvent par la présence de leurs résidus dans le lait produit par la vache traitée.

Il en ressort, d'après les résultats obtenus, que 61% des échantillons sont trouvés exemptes de traces de résidus d'antibiotiques alors que $\frac{1}{4}$ des échantillons présentent des résidus de substances inhibitrices. La présence des inhibiteurs reflète une utilisation abusive et anarchique d'où l'importance d'appliquer des mesures réglementaires plus strictes dans le circuit des produits vétérinaires. Les résultats douteux (13%) dans ce travail peuvent être expliqués par le fait que les substances inhibitrices sont présentes à une concentration proche de seuil de détection par le test Delvotest.

En Algérie, les informations relatives à l'importance de la contamination du lait cru par les résidus d'ATB restent extrêmement limitées. Le taux général révélé (26%) est proche de celui rapporté par **Srairi et Hamama (2006)**. Ce chiffre, quoique élevé, n'est pas un indicateur fidèle de l'ampleur du phénomène, d'où la nécessité d'une enquête de grande envergure.

La présence de résidus d'ATB dans le lait peut parfois constituer un danger pour le consommateur en déclenchant dans de rares cas accidents allergiques (**Dewdney et al., 1991**), toxiques (**Pawelczak et al., 2002**) ou encore en favorisant l'émergence d'une microflore multi-résistante; mais également et surtout être à l'origine de perturbations importantes des processus de fermentation et de

maturation des produits laitiers de large consommation tels que yaourts, fromages et autres laits fermentés (**Mitchell *et al.*, 1998**).

A titre d'exemple, il a été montré que 0.1 et 0.05 unités/ml de résidus de pénicilline ralentissaient la production d'acide lactique induisant ainsi, outre la détérioration de la qualité du fromage produit, le développement possible de microorganismes pathogènes au cours du processus de maturation. Ces conséquences technologiques dépendent essentiellement de la dose résiduelle d'inhibiteurs dans le lait collecté et la sensibilité des germes lactiques utilisés aux ATB (**Mitchell *et al.*, 1998 ; Mensah *et al.*, 2014**).

Il devient dès lors évident que les résidus inhibiteurs devraient constituer une préoccupation constante des industriels de la filière laitière en Algérie, de par la dépréciation qualitative et quantitative de la production laitière qu'ils induisent. Par conséquent, la mise en place d'un système de contrôle régulier pour ne pas dire systématique du lait destiné à la transformation devient dès lors nécessaire pour cette filière (**Aggad *et al.*, 2009 ; Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009 ; Titouche *et al.*, 2013**).

Les résidus antibactériens proviennent du traitement des maladies et de l'alimentation ; ils regroupent les bactériostatiques, antifongiques, antibiotiques et des pesticides en proportions variables. Cependant, les méthodes microbiologiques de leur détection dans le lait ne donnent pas d'indication sur l'identité de la substance inhibitrice. L'évaluation des risques éventuels d'ordre sanitaire ou technologique, associés à leur présence, passe par une connaissance qualitative et quantitative préalable de ceux-ci (**Labie, 1981**).

Cependant et dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure de déterminer avec précision l'identité de la substance inhibitrice pouvant être présente dans le lait cru.

Malgré son aspect qualitatif, la recherche de résidus d'ATB par la technique microbiologique (Delvost) reste une technique simple à mettre en œuvre et peu coûteuse comparée aux techniques immunologiques et chromatographiques dont le coût considérablement plus élevé ne permettrait certainement pas leur généralisation dans le cadre du contrôle laitier en Algérie.

En parallèle, de nombreuses méthodes permettent la détection et, dans certains cas, l'identification précise des molécules ATB présentes dans le lait. Elles diffèrent par leur sensibilité, leur coût et les difficultés techniques inhérentes à leur réalisation. Certaines comme l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou la LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) (**Riediker *et***

al., 2001 ; Jank *et al.*, 2012) permettent outre une identification précise de la molécule en cause, une quantification fine de celle-ci.

CONCLUSION

Le lait constitue un milieu favorable à la croissance de plusieurs germes microbiens dont certains sont pathogènes et peuvent être à l'origine de plusieurs intoxications ou toxi-infections alimentaires. Il doit répondre à des normes drastiques, afin d'assurer une qualité irréprochable tant sur le plan microbiologique que toxicologique.

L'objectif principal de notre travail consistait à estimer la qualité bactériologique du lait de vache cru commercialisé au niveau de plusieurs communes de la wilaya de Blida. Au total, 54 échantillons ont été prélevés et analysés selon les normes en vigueur.

La mise en évidence de la qualité du lait de vache cru a permis de prouver que le produit, mis sur le marché ou entre les mains des industriels, est fortement contaminé. Certains prélèvements peuvent même contenir une association de germes. La totalité des échantillons ne répond pas à la norme recommandée dans ce domaine (critères microbiologiques fixés par le Journal Officiel), ce qui signe des mauvaises conditions d'hygiène entre le moment de la traite et celui de la réception des échantillons par le laboratoire.

La grande variabilité de la contamination des échantillons du lait dévoile une situation alarmante de la qualité de ce produit. La majorité des échantillons peuvent être qualifiés de qualité non satisfaisante car ils dépassent de loin la norme recommandée, notamment en ce qui concerne la flore indicatrice de qualité hygiénique. La présence de germes responsables d'intoxication alimentaire tels que *Staphylococcus aureus* peut devenir un problème de santé publique si des mesures ne sont pas prises pour éviter les contaminations. Le développement de la filière lait avec l'organisation des producteurs, la création de centres de collecte et l'utilisation de la chaîne de froid peut permettre de réduire les contaminations.

Sur le plan technologique, ces laits sont considérés comme fortement pollués et risquent de compromettre le bon déroulement des opérations de transformation fromagère.

Sur le plan nutritionnel, l'accroissement des activités métaboliques microbiennes conduit à un abaissement de la valeur nutritionnelle du lait et de ses dérivés, du fait de la dégradation de ses constituants.

Sur le plan sanitaire, la présence des germes pathogènes (staphylocoques à coagulase positive) présente un risque d'intoxication alimentaire par l'ingestion d'entérotoxines thermostables.

L'amélioration de la qualité du lait local ne peut se faire que par des mesures d'hygiène adaptées. La mauvaise qualité hygiénique du lait local pouvant constituer un risque pour la santé publique, les autorités chargées du contrôle des denrées alimentaires devraient mettre en place une politique de qualité avec la vulgarisation des bonnes pratiques d'hygiène et un encadrement zootechnique de tous les acteurs de la filière. De plus, la diffusion d'un avis recommandant à la population de faire bouillir le lait local avant toute consommation devrait être faite.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aboutayeb R. 2009. Technologie du lait et dérivés laitiers. Azaquar, 3-35p.
2. Affif A, Faid M, Chigr F, Najimi M. 2008. Survey of the microbiological quality of the raw cow milk in the Tadla area of Morocco. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 4.
3. Aggad H, Mahouz F, Ahmed Ammar Y, Kihal M. 2009. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160, 590-595.
4. Alais C. 1984. Science du lait : principes des techniques laitières, Edition Sepaic: Paris, France, 207-476.
5. Alais C, Linden. 1997. Abrège de biochimie alimentaire. 6^{ème} Edition Masson, Paris, France, p 535.
6. Alais C, Linden G, Miclo L. 2003. Biochimie alimentaire. 5^{ème} édition de l'abrégé, Paris, France, p165.
7. Ameer A, Rahal K, Bouyoucef A. 2012. Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie). *Revue Nature & Technologie*, 6, 81.
8. Amhoury F, Saidi B, Hamama A, Zahar M. 2010. Qualité microbiologique du lait cru: Cas de la région d'Errachidia. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 18(1), 31-35.
9. Arimi SM, Omare AO, Dermot J. 2000. Risk of infection from *E. coli* O157:H7 through informally marketed raw milk in Kenya. Oral presentation at the 3 All Africa Conference on animal agriculture.
10. Aumaitre A. 1999. Quality and safety of animal products. *Livestock Product Science*, 59, 113–124.
11. Baazize D. 2005. Qualité hygiénique et sanitaire du lait cru de vache. Mémoire de Magistère en hygiène et qualité du lait, Université Saad Dahleb de Blida (Algérie).
12. Badinand F. 1994. Maitrise du taux cellulaire du lait. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 170, 7, 419-427.
13. Beerens H, Luquet FM. 1987. Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et des produits laitiers. Technique et Documentation Lavoisier, France.
14. Belhadia M, Yakhlef H, Bourbouze A, Djermoun A. 2014. Production et mise sur le marché du lait en Algérie, entre formel et informel. Stratégies des éleveurs du périmètre irrigué du Haut-Cheliff. *New medit: Mediterranean Journal of Economics, Agriculture and Environment*, 13(1), 41-49.
15. Ben Hassen S, Messadi L, Ben Assen A. 2003. Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite. In *Annales de médecine vétérinaire* (Vol. 147, No. 1, pp. 41-47). Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire.
16. Ben-Mahdi MH, Ouslimani S. 2009. Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois. *European Journal of Scientific Research*, 36, 357-362.
17. Beuvier E. 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. INRA- Unité de Recherche en Technologie et Analyse Laitières, 6p.
18. Bonfoh B, Fane A, Steinmann P, Traore AN. 2004. Lait sain pour le Sahel. Etudes et Recherches Sahelhiennes. N. Spécial no. 8/9, 7–216. Bamako, Mali.
19. Boor KJ, Brown DP, Murphy SC, Koslowski SM, Bandlar DK. 1998, Microbiological and chemical band quality of raw milk in New York state. *Journal of Dairy Science*, 81, 1743-1748.
20. Bouise M, Leveau JY. 1993. Microbiologie industrielle: les microorganismes d'intérêt industriel. Collection Science et Techniques, Edition Techniques et Documentation, Lavoisier, France.
21. Bourgeois CM, Mesale JF, Zucca J. 1990. Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Edition Techniques et alimentation, Lavoisier, Paris, France, p422.
22. Bourgeois CM, Leveau JY. 1991. Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires : Le contrôle microbiologique. Edition Tec & doc, Lavoisier, Paris, France, p454.
23. Bourgeois CM, Larpent JP. 1996. Microbiologie alimentaire : Aliment ferments et fermentation alimentaire, collection Science et Techniques Agro-alimentaire, 2^{ème} édition, France.
24. Brouillet P. 1994. Maîtrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait, recueil de médecine vétérinaire, Maison Alfort: p 492.
25. Butel M, & Ouzrout R. 2012. Prévalence des principales bactéries responsables de mammites sub-cliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 65(1-2).
26. Caratolli A. 2001. Importance des intégrants dans la diffusion de la résistance. *Veterinar Research*, 32, 3-4.

27. Cauty I, Perreau JM. 2003. la conduite du troupeau laitier. Edition France Agricole, 62, 288.
28. Cayot PH, Lorient D. 1998. Structures et techno fonctions des protéines du lait. Edition Tech &Doc, Lavoisier, Paris, 363 p.
29. Chye F.Y., Aminah A., Mohd Khan A. 2004. Bacteriological quality and safety of raw milkin Malaysia. *Food Microbiology* 21, 535–541.
30. Cuq JL. 2007. Microbiologie Alimentaire: Les relations microorganismes/aliments/consommateurs, Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. p, 2-17.
31. Debry G. 2001. Lait, nutrition et santé. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, 24, 37.
32. Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, Paris, France.
33. Dieng M. 2001. Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés industriels commercialisés sur le marché Dakarois. Thèse de Médecine Vétérinaire, Dakar, Sénégal, n°10, 91 p.
34. Durel L, Goby L, Boringher I. 2010. Un regard pratique sur les mammites contagieuses. Groupe de défense sanitaire des animaux de la Manche : NMC, organisation mondiale pour le contrôle de la mammité et la qualité du lait, 8p. Site Internet du NMC : www.nmconline.org
35. El Hassani SK. 2013. La Dépendance Alimentaire en Algérie: Importation de Lait en Poudre versus Production Locale, Quelle Evolution?. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4(11), 152.
36. FAO (Food Agriculture Organization of the United Nation). 1998. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaines: Alimentation et nutrition, Rome, Italie, n° 20.
37. Farhan M, Salik S. 2007. Evaluation of Bacteriological Contamination in Raw (Unprocessed) Milk Sold in Different Regions of Lahore (Pakistan). *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 3, 104–106.
38. Ghazi K, Niar A. 2011. Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura*, 29(4), 193-196.
39. Grenon C, Fournier S, Goulet J. 2004. Lait de qualité : Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ : Centre de Recherche en Agriculture et Agroalimentaire du Québec, Canada, 33p.
40. Guillet F, Bonnefoy C, Leyral G, Verne-Bourdais É. 2002. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Wolters Kluwer France.
41. Guiraud JP. 1998. Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris, France.
42. Hakem A, Yabrir B, Khelef D, Laoun A, Mouffok F, Nazek EG, Aissa RB. 2013. Evaluation of Microbial Quality of Raw Milk into two Dairies Mitidja's Farms (Algeria). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 69(1-2).
43. Hanzen CH. 2009. Lait et production laitière. Faculté de Médecine Vétérinaire, Service de Thériogenologie des animaux de production.
44. Hartheiser M. 1994. La maîtrise de la contamination du lait par les spores butyriques. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 107, n° 6/7, p 429,436.
45. Heuchel V, Meffe N. 2000. Contamination du lait de vache par les bactéries pathogènes : principaux facteurs de risque à la production - dangers liés à la traite. Institut de l'Élevage, Paris, France, 5p.
46. Jank L, Hoff RB, Tarouco PC, Barreto F, Pizzolato TM. 2012. β -lactam antibiotics residues analysis in bovine milk by LC-ESI-MS/MS: a simple and fast liquid-liquid extraction method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(4), 497-507.
47. Joly B, Reynaud A. 2003. Entérobactéries, systématique et méthode de diagnostic. Edition Lavoisier, Paris, France, p 356.
48. JORA (1998). Arrêté Interministériel n° 35 du 27 Mai 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées. Ministère du commerce, Algérie.
49. Kouamé-Sina SM, Bassa A, Bonfoh, B. 2010. Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)*, 35-42.
50. Kroon CA. 2005. Identification des démarches visant à mieux raisonner l'utilisation des antibiotiques en élevage bovin laitier: une enquête Européenne. Université Paul-Sabatier Toulouse, France.
51. Labie C. 1981. Dispositions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, France.

52. Labioui H, Elmoualdi L, Berny H, Ouhssine M. 2009. Etude physicochimique et microbiologique de laits crus. Bulletin de la Société Pharmaceutique de Bordeaux, 148, 7-16.
53. Larpent JP. 1997. Microbiologie alimentaire technique de laboratoire. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p 705-729.
54. Leyral G, Vierling E. 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments. Wolters Kluwer, France.
55. Luquet FM. 1986. Lait et produits laitiers. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, 70-445.
56. Mahaut M, Jeautet R, Schuct P, Brule G. 2005. Les produits industriels laitiers. Edition Tech & Doc, Paris, France.
57. Mathieu J. 1998. Initiation à la physicochimie du lait. Edition Tec & DOC, Paris, France, 179, 181, 204.
58. Mc Dowell RM, Mc Elvaine MD. 1997. Séquelles chroniques des toxi-infections alimentaires. Rev Sci Tech, 162.
59. Mennane Z, Ouhssine M, EL Yachioui M. 2007. Hygienic quality of raw cow's milk feeding from domestic waste in two regions in Morocco. International Journal of Agriculture and Biology, 9, 46-48.335
60. Mensah SEP, Aboh AB, Salifou S, Mensah GA, Sanders P, Abiola FA, Koudandé OD. 2014. Risques dus aux résidus d'antibiotiques détectés dans le lait de vache produit dans le Centre Bénin. Journal of Applied Biosciences, 80(1), 7102-7112.
61. Mhone TA, Matope G, Saidi PT. 2011. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology, 151(2), 223-228.
62. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. Journal of Food Protection, 61(6), 742-756.
63. Moll M, Moll N. 1995. Sécurité alimentaire du consommateur. Edition Lavoisier, Paris, France, p300.
64. Mwangi A, Kang Ethe EK, Omere AO. 2000, Assurance of marketed milk quality in Kenya, Paper presented at the faculty of veterinary medicine Biennial Scientific Conference, University of Nairobi, Kenya.
65. Ngabet Njassap VH. 2001, Contribution à l'étude de la qualité microbiologique du lait fermenté commercialisé dans les rues de Yaoundé, Cameroun. Thèse Médecine Vétérinaire, Dakar, Sénégal, n°11.
66. OMS, FAO. 2007. Lait et produits laitiers, 1^{ère} édition. Codex Alimentarius, Rome, Italie, 258.
67. Pavaux C. 1982. Atlas en couleurs d'anatomie des bovins, Paris, France.
68. Pawelczak K, Makowski M, Golos B, Rode W, Rzeszotarska B. 2002. Sulfamide antifolates inhibiting thymidylate synthase: synthesis, enzyme inhibition and cytotoxicity.
69. Pougheon SIA. 2001. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France, 102p.
70. Raynaud S. 2005. Etude sur la contamination du lait par les bactéries coliformes en Bretagne, Rapport final, Institut d'élevage, France.
71. Riediker S, Diserens JM, Stadler RH. 2001. Analysis of β -lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(9), 4171-4176.
72. Scholl D. 2009. La recherche sur la mammite - Quoi de neuf. Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Canada, 16p.
73. Srairi MT, Hamama A. Qualité globale du lait cru de vache au Maroc, concepts, état des lieux et perspectives d'amélioration. Transfert de technologie en agriculture, 2006, 137, 1-4.
74. Sutra L, Federighi M, Joue L-M., 1998. Manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica.
75. Titouche Y, Hakem A, Houali K, Yabrir B, Malki O, Chergui A, Fit N. 2013. Detection of Antibiotics Residues in Raw milk Produced in Freha Area (Tizi-Ouzou), Algeria. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine, 70(1), 83-87.
76. Vignola CL. 2002. Science et technologie du lait. Edition Presses Internationales Polytechniques, Canada, 29, 54, 55.

1. Matériels

❖ Appareillages

- Etuve réglable à différentes températures
- Bain marie réglable à différentes températures
- Microscope optique
- Delvost

❖ Verrerie

- Tubes à vis stériles
- Lames
- Lamelles
- Pipettes graduées de 1 ml, 10 ml et 25 ml Pipettes pasteur stériles
- Flacons stériles de 225 ml
- Boîtes de pétris

2. Milieux de culture

Milieux liquides

- Bouillon Eva litsky
- Bouillon de Rothe s/c
- Bouillon VBL Bouillon Lactose Bilié au Vert Brillant
- Bouillon Giolitti Cantoni
- Bouillon sélénite cysteine (SFB)
- Eau Peptonée Exempte d'Indole (EPEI)
- Tryptone- Sel- Eau (TSE)

Milieux Gélosés

- Gélose Hektoen
- Gélose Chapman
- Gélose Plate Count Agar (PCA)

5. Réactifs, solutions et colorants

- Alcool 95%
- Eau oxygénée 10 volumes
- Réactif de Kovacs
- Eau Physiologique
- Eau distillée
- Huile à émulsion
- Fushine basique phéniquée Lugol
- Violet de gentiane
- Tellurite de potassium Additif Hektoen

6. Produits biologiques

- Plasma humain

Annexe (2)

Tableau 2.1 : Résultat des analyses microbiologiques des laits analysés

Origines & localités	Lait analysé (nombre)		FAMT UFC/ml		Coliformes Totaux UFC/ml		Coliformes Fécaux UFC/ml		Streptocoques Fécaux		<i>S. aureus</i>	
			≤10 ⁵	>10 ⁵	≤10 ³	>10 ³	≤10 ³	>10 ³	Abs	Prés	Abs	Prés
Ouled yaiche	12	Nbr	03	09	03	09	06	06	03	09	04	08
		%	25	75	25	75	50	50	25	75	33.33	66.66
Beni mered	06	Nbr	02	04	03	03	04	02	02	04	03	03
		%	33.33	66.66	50	50	66.6	33.3	33.3	66.66	50	50
Soumaa	06	Nbr	01	05	02	04	05	01	03	03	02	04
		%	16.66	83.33	33.3	66.6	83.3	16.6	50	50	33.33	66.6
Larbaa	03	Nbr	01	02	01	02	02	01	03	0	01	02
		%	33.3	66.6	33.3	66.6	66.6	33.3	100	0	33.33	66.66
Blida	04	Nbr	02	02	02	02	02	02	01	03	02	02
		%	50	50	50	50	50	50	25	75	50	05
Afroune	07	Nbr	05	02	02	05	05	02	05	02	00	07
		%	71.42	28.57	28.57	71.42	66,6	28.57	71.42	28.57	00	100
Mouzaya	03	Nbr	02	01	01	02	03	00	02	01	01	02
		%	66.66	33.33	33,33	66,6	100	00	66,6	33,3	33.3	66.6
Chefa	03	Nbr	00	03	00	03	00	03	00	03	01	02
		%	00	100	00	100	00	100	00	100	33.3	66.6
Boufarik	07	Nbr	02	05	00	07	03	04	02	05	00	07
		%	28.57	71.42	00	100	42.8	57.14	28.57	71.42	00	100
Guerouaou	03	Nbr	03	00	02	01	02	01	03	0	00	03
		%	100	00	66.6	33.33	66.6	33.33	100	00	00	100
Total	54	Nbr	21	33	16	38	32	22	24	30	14	40
		%	38.88	61.11	29.62	70.37	59.25	40.74	44.44	55.55	25.92	74.07

N°		FAMT UFC/ml.10 ⁵	CT UFC/ml	CF UFC/ml	S. aureus	Strep fécaux	Clostridium	Salmonelles
01	Ouledyaich	45.3	1400	1100	Absence	0	Absence	Absence
02	Ouledyaich	40	1400	1400	presence	40	Absence	Absence
03	Benimared	15	1400	1100	presence	250	Absence	Absence
04	Benimared	10.9	1400	45	Absence	0	Absence	Absence
05	Soumaa	20	1400	30	Absence	0	Absence	Absence
06	Soumaa	8	200	90	Absence	30	Absence	Absence
07	Larabaa	0.6	0	0	Absence	0	Absence	Absence
08	Blida	85	1400	1400	presence	450	Absence	Absence
09	Afroune	120	1400	1400	Absence	14	Absence	Absence
10	Afroune	146	1400	70	Absence	70	Absence	Absence
11	Mouzaya	50	1400	30	presence	11	Absence	Absence
12	Chefa	70.8	1400	1100	presence	0	Absence	Absence
13	Boufarik	15	1400	40	presence	70	Absence	Absence
14	Boufarik	76	1400	160	presence	70	Absence	Absence
15	Guerouaou	8	115	115	Absence	20	Absence	Absence
16	Ouledyaich	55	1400	1400	presence	20	Absence	Absence
17	Ouledyaich	6	0	0	presence	25	Absence	Absence
18	Blida	33	1400	1100	presence	450	Absence	Absence
19	Boufarik	64	1400	1100	presence	450	Absence	Absence
20	Ouledyaich	21	1400	200	Presence	0	Absence	Absence
21	Ouledyaich	30	1400	1100	Absence	0	Absence	Absence
22	Bnimared	10.3	15	6	absence	250	Absence	Absence
23	Bnimared	17.4	1400	1100	presence	450	Absence	Absence
24	Soumaa	71	1400	25	presence	11	Absence	Absence
25	Soumaa	12.8	250	0	Absence	450	Absence	Absence
26	Larabaa	34	1400	110	absence	11	Absence	Absence
27	Blida	26.4	250	15	absence	0	Absence	Absence
28	Afroune	16.8	250	45	absence	25	Absence	Absence
29	Afroune	13.4	250	0	presence	7	Absence	Absence
30	Mouzaya	27.2	1400	15	absence	0	Absence	Absence
31	Chefa	80	1400	1400	Presence	1400	Absence	Absence
32	Boufarik	140	1100	1100	absence	450	Absence	Absence
33	Boufarik	87.6	1400	1400	Presence	450	Absence	Absence
34	Guerouaou	6.7	1400	25	Absence	9	Absence	Absence
35	Ouledyaich	38	450	0	Absence	4	Absence	Absence
36	Ouledyaich	76	1400	65	Presence	20	Absence	Absence
37	Ouledyaich	28.8	450	25	Presence	45	Absence	Absence
38	Boufarik	48	1400	1400	Presence	1100	Absence	Absence
39	Ouledyaich	5	1400	25	Presence	0	Absence	Absence
40	Ouledyaich	156	1400	1400	Presence	150	Absence	Absence
41	Bnimared	13.7	300	0	Presence	0	Absence	Absence
42	Bnimared	15	90	0	Absence	0	Absence	Absence
43	Soumaa	56.8	1400	1100	Presence	1100	Absence	Absence
44	Soumaa	27.2	1400	25	Presence	0	Absence	Absence
45	Larebaa	30	1400	250	Absence	9	Absence	Absence
46	Blida	14.6	250	45	Presence	0	Absence	Absence
47	Afroune	12	1400	115	Absence	40	Absence	Absence
48	Afroune	40.6	1400	1400	Presence	150	Absence	Absence
49	Mouzaia	28.8	450	25	Absence	25	Absence	Absence
50	Chiffa	66.4	1400	1400	Presence	1100	Absence	Absence
51	Affroune	9.2	1400	0	Absence	40	Absence	Absence
52	Boufarik	61	1400	450	Absence	30	Absence	Absence
53	Guerouaou	2.2	450	115	Absence	450	Absence	Absence
54	Ouled- Yaich	91.5	1400	1400	Presence	40	Absence	Absence

Tableau 2.2 : Résultats des analyses microbiologiques de prélèvements de lait des crémèries de la wilaya de Blida.

Tableau 2.3 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans les prélèvements de lait des crémeries de la wilaya de Blida.

N°		antibiotiques
01	Ouledyaich	Absence
02	Ouledyaich	Absence
03	Benimared	presence
04	Benimared	Absence
05	Soumaa	presence
06	Soumaa	Absence
07	Larabaa	presence
08	Blida	Absence
09	Afroune	Absence
10	Afroune	Absence
11	Mouzaya	presence
12	Chefa	presence
13	Boufarik	presence
14	Boufarik	Absence
15	Guerouaou	Absence
16	Ouledyaich	Absence
17	Ouledyaich	Absence
18	Blida	Absence
19	Boufarik	Absence
20	Ouledyaich	Absence
21	Ouledyaich	presence
22	Bnimared	Absence
23	Bnimared	presence
24	Soumaa	Absence
25	Soumaa	presence
26	Larabaa	Absence
27	Blida	presence
28	Afroune	Absence
29	Afroune	Absence
30	Mouzaya	Absence
31	Chefa	Absence
32	Boufarik	Absence
33	Boufarik	présence
34	Guerouaou	Absence
35	Ouledyaich	Plus ou moins
36	Ouledyaich	Absence
37	Ouledyaich	présence
38	Boufarik	Absence
39	Ouledyaich	Plus ou moins
40	Ouledyaich	Absence
41	Bnimared	Plus ou moins
42	Bnimared	Absence
43	Soumaa	Plus ou moins
44	Soumaa	Absence
45	Larebaa	Absence
46	Blida	Plus ou moins
47	Afroune	Absence
48	Afroune	Absence
49	Mouzaya	Absence
50	Chefa	Plus ou moins
51	Afroune	Absence
52	Boufarik	présence
53	Guerouaou	Absence
54	Ouledyaich	Plus ou moins

INTRODUCTION

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES