

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE KASDI MERBAH –OUARGLA

Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur

Département de Biologie

Mémoire de Fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme d'Etudes supérieures en biologie

Option : Microbiologie.

Thème

**Contribution à la connaissance du lait camelin :
Etude de l'effet du composant 3 des protéose –peptones (PP3)
contre la flore indigène et la flore exogène du lait camelin**

Présenté par :

**BENHANNA Messaouda
BENKABOUYA Nadia
MECHRI Iman**

Jury :

Président :	Mr OULD EL HAJD M^{ed} Didi	(MACC, Université de Ouargla)
Promoteur :	M^{me} SIBOUKEUR Oumelkhir	(MACC, Université de Ouargla)
Co-promoteur :	M^{elle} MIMOUNI Yamina	--(A, Université de Ouargla)
Examineur :	Mr BENSACI Messaoud	(MACC, Université de Ouargla)

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2005 /2006

Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier particulièrement notre promotrice M^{me} SIBOUKEUR Oumelkhir, maître assistante chargée de cours à la faculté des sciences et sciences de l'ingénieur, Université KASDI MERBAH - Ouargla, d'avoir proposé et dirigé ce travail, pour toute l'aide qu'elle nous a fournie pendant la préparation de ce mémoire.

Nous adressons nos remerciements à:

Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi, maître de conférences à la faculté des sciences et sciences de l'ingénieur, Université KASDI MERBAH - Ouargla, d'avoir accepté de présider ce jury.

Mr BENSACI Messaoud Bacha Agha, maître assistant chargé de cours à la faculté des sciences et sciences de l'ingénieur, Université KASDI MERBAH - Ouargla, d'avoir accepté de porter un jugement à ce modeste travail.

M^{lle} MIMOUNI Yamina, membre de l'équipe « Ecodeveloppement camelín » Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones arides et semi-arides. Pour nous avoir aidées à réaliser la partie pratique de nos investigations.

Nous remercions également Mr BEGGARI A, Ingénieur responsable des laboratoires pédagogiques des Départements de Biologie et Agronomie, ainsi que M^{lle} SAYAH Zineb et les laborantins de l'hôpital Mohamed BOUDIAF en particulier Mr BAHY et M^{lle} BALKOU Halima, pour Leur précieuse aide.

En fin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

Résumé

Le lait de chamelle est à classer parmi les produits ayant une grande valeur nutritive, vu sa teneur élevée en nutriments de base, son taux relativement élevé en vitamine C, en niacine et son système protecteur très efficace, du à une richesse en lysozyme, en lactopéroxydase, en lactoferrine et en protéose –peptones 3 (PP3).

L'objectif assigné au présent travail est d'étudier l'effet du PP3 vis-à-vis des flores indigène et de contamination de lait camelin.

Nous avant d'abord, procédé à l'isolement de cinq groupes bactériens susceptibles de se développer dans le lait camelin puis étudié l'action inhibitrice du PP3 contre ces groupes, par la méthode des disques.

Les résultats obtenus sont de nature à suspecter le PP3, comme une molécule faisant partie des molécules protectrices naturelles du lait camelin. Il semble présenter, un effet inhibiteur de la croissance des germes Gram positifs (Gram +) de contamination, notamment les halophiles. Cet effet inhibiteur de PP3 semble relativement moins accentué en ce qui concerne la flore Gram négatifs (Gram –) de contamination (entérobactéries). Les études a montré également, que le PP3 est sans action sur la flore indigène, notamment les lactobacilles.

Mots clés : lait, camelin, contamination, système protecteur, PP3, disques.

Summary

The milk of she-camel which is classified among the product having a great food value has its high percentage of basic nutrients, which are relatively rich in vitamin C, niacine, and its very effective protective system, that contains lysozyme, lactopéroxydase, lactoferrine and protéose-peptones 3 (PP3).

The aim of the present work is to study the effect of the indigenous PP3 on the flora and she-camel milk contamination.

First, we proceed to the insulation of four bacterial groups that develop in she-camel milk, and then we study the inhibiting action of the PP3 against these groups using the method of discs.

The results obtained are likely to consider PP3, as a molecule forming a part of the natural protective molecules of this kind of milk. It seems to present the inhibiting effect of the growth of positive Gram germs (Gram +) of contamination, in particular the halophilous ones. This inhibiting effect of PP3 seems relatively less accentuated with regard to negative Gram flora (Gram -) of contamination (entérobactéries). Our study also shows that the PP3 has no effect on the indigenous flora, in particular, the lactobacilles.

Key words: milk, she-camel, contamination, protective system, PP3, discs.

ملخص

يصنف حليب الناقة من بين أهم المواد الغذائية ذات القيمة العالية بسبب احتوائه على نسبة كبيرة من المواد الغذائية الأساسية، و نسبة معتبرة من فيتامين ج و niacine ، كما أنه يحتوي على نظام وقائي فعال غني بـ : lysozyme ، lactoperoxydase ، lactoferrine ، proteose-peptone3.

هذا العمل يهدف إلى دراسة تأثير البروتياز ببتون (PP3) ضد البكتيريا الأصلية الموجودة في حليب الناقة و البكتيريا الملوثة له .

قمنا بعزل أربعة مجموعات بكتيرية قابلة للنمو في حليب الناقة ثم درسنا تأثير PP3 ضد هذه المجموعات ، وهذا باستعمال طريقة الأفراس .

النتائج المحصل عليها تبين أن PP3 هو عبارة عن عنصر من عناصر الوقاية الطبيعية الموجودة في حليب الناقة، حيث يملك تأثير مضاد للبكتيريا الملوثة ذات الجرام الموجب خاصة les halophiles ، لكنه أقل تأثير بالنسبة للبكتيريا ذات الجرام السالب (entérobactéries) ، و أثبتت الدراسة أيضا أن PP3 لا يآثر على البكتيريا الأصلية الموجودة في حليب الناقة خاصة lactobacilles .

الكلمات المفتاحية : الحليب، الجمل، النظام الوقائي، الأفراس.

LISTE DES ABRÉVIATION UTILISÉES

Abréviation utilisée	Signification
AFNOR	Association Française de Normalisation
BBT	bleu bromothymol
LCP	Lait Camelin avec PP3
LCS	Lait Camelin sans PP3
FPP (T)	Fraction de Protéose- Peptone totale
FPLC	Fast Proteine Liquid Chromatography
LHP	Lait Low Heat avec PP3
LHS	Lait Low Heat sans PP3
μ	micron
MRS	Man, Rogosa et Sharpe
N.Z.I	Nombre des Zones d'Inhibition
PH	Potentiel d'Hydrogène
PP3	Protéose- Peptone 3
UFC	Unité Formant Colonie
VRBG	gélose au cristal violet rouge neutre et à la bile

SOMMAIRE

	Page
Introduction	01
PREMIERE PARTIE :SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralités.....	03
1. Sur le dromadaire	03
2. Lait de chamelle.....	04
3. Les protéoses-peptones.....	05
II. Matériel d'étude.....	07
1. Lait camelin.....	07
2. poudre de Lait écrémé « Low Heat ».....	07
3. Protéose-peptone 3.....	07
4 Milieux de culture	07
III Méthodes analytiques	10
1. Mesure du pH	11
2. Analyses microbiologiques.....	11
2.1 Test de la réductase.....	11
2.2 Etude de la flore microbienne.....	11
2.2.1 Culture de la flore microbienne	12
2.2.1.1 Culture des halophiles.....	12
2.2.1.2 Culture des entérobactéries.....	13
2.2.1.3 Culture et dénombrement des entérobactéries pathogènes	13
2.2.1.4 Culture des coliformes	14
2.2.1.5 Culture et dénombrement des lactobacilles.....	14
2.2.2 Observations macroscopiques	14
2.2.2.1. Description des colonies.....	14
2.2.2.2 Test de catalase	15
2.2.3 Observations microscopiques.....	15
2.2.3.1 Examen à l'état frais.....	15
2.2.3.2 Examen a prés coloration de Gram.....	16

2.3	Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	17
2.3.1	Définition des antibiotiques.....	17
2.3.2	Antibiogramme(Méthode des disques).....	17
2.3.3	Techniques d'antibiogramme (Méthode des disques)	17

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Mesure du pH	21
1.1.	Résultats.....	21
1.2.	Discussion.....	21
2.	Analyse microbiologique	21
2.1	Test de la réductase.....	21
2.1.1	Résultats.....	21
2.1.2	Discussion.....	22
2.2	Observations macroscopiques et microscopiques.....	22
2.2.1	Résultats.....	22
2.2.2	Discussion.....	26
2.3	Evolution des lactobacilles et des entérobactéries pathogènes du lait en fonction des conditions de la durée de l'entreposage	27
2.3.1	Résultats.....	27
2.3.2	Discussion	27
2.4	Recherche de l'effet du PP3 sur les différents groupes microbiens.....	28
2.4.1	Résultats.....	28
2.4.2	Discussion et conclusion.....	34
	Discussion générale	35
	Conclusion générale	36
	Références bibliographiques et électroniques	37
	Annexes	42

Introduction

Introduction

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment complet. En effet, les protides, les glucides, les lipides, les sels minéraux et les vitamines sont présents à des concentrations tout à fait satisfaisantes pour la croissance de l'homme.

D'autre part, le lait constitue, au sens écologique du terme un " écosystème ". Les microorganismes existant dans notre environnement vont trouver dans le lait un substrat idéal pour leur développement. Ainsi, la présence de nombreux facteurs de croissance permettra de satisfaire de nombreuses espèces microbiennes exigeantes et difficiles à cultiver dans un milieu moins complet (LARPENT, 1997).

Nous nous sommes intéressés dans la présente étude, au lait de chamelle qui est important dans l'apport nutritionnel de la population sud du pays. Son intérêt particulier tient au fait qu'il est riche en vitamine C et en niacine. En plus, sa concentration en protéose-peptones 3 (PP3) est supérieure à celle des laits d'autres espèces (bovine, caprine et ovine). Cependant, le PP3 camelin, possède un seul site de glycosylation contrairement aux PP3 des laits des autres espèces qui généralement en contiennent plusieurs (GIRARDET *et al*, 2000). Ces auteurs ont suggéré que le PP3 pourrait jouer un rôle dans la protection du chamelon contre les attaques microbiennes (GIRARDET *et al*, 2000).

D'autre part, des études récentes, ont montré que le taux de germes pathogènes de contamination, diminue au fur et à mesure que la durée de l'entreposage du lait camelin augmente, (ABIDI, 2001; DAOUD, et GUESSEIR, 2003). Cette autoépuration du lait camelin peut s'expliquer par la présence d'une activité antimicrobienne naturelle intense due à la présence du lysozyme en quantité, trois fois plus élevée que pour le lait bovin, de lactoferrine, de lactoperoxydase et des immunoglobulines (DUHAIMAN, 1988 ; ELAGAMY *et al*, 1996 ; GNAN *et al*, 1994; RAMET, 1994).

Notre travail, s'inscrit dans ce cadre précis et consiste en une contribution à la connaissance du lait camelin par l'étude de l'effet du composant 3 des protéose-peptones (PP3) contre la flore endogène et la flore exogène du lait camelin.

Cette étude est composée de deux parties essentielles :

- Isolement et culture de la flore naturelle et de la flore pathogène de contamination à partir des échantillons de lait camelin cru.
- Comportement de cette microflore vis à vis du PP3 par les tests d'antibiogrammes (méthodes des disques).

Premier partie
Syntheses bibliographiques

Généralités

I. Généralités

1. Sur le dromadaire

L'espèce cameline dont il s'agit est l'espèce *Camelus dromedarius*, c'est à dire le chameau à une seule bosse. D'après la classification établie par les zoologistes le chameau appartient :

- A la classe : Mammifères.
- A la famille : Camelidées.
- Au genre : Camelus.
- A l'espèce : *Camelus dromedarius*. (chameau Arabe ou dromadaire) (SIMPSON, 1945, in AZZI et BOUCETTA, 1993).

Ces animaux vivent dans des régions chaudes à faible pluviométrie (l'humidité excessive est défavorable pour la survie du dromadaire), arides et semi-arides de l'Afrique du Nord, de l'Est de l'Inde, de l'Afghanistan et du sud de l'ex URSS.

Le dromadaire consomme des espèces végétales très variées (arbres fourragers, plantes herbacées, Poaceae, Fabaceae, plantes ligneuses, plantes salées, etc....) (FAYE et TISSERAND, 1988 ; in AZZI et BOUCETTA, 1993), et peuvent subir des périodes assez longues sans boire.

Les nomades du désert dépendent du chameau pour leur survie. Les chamelles fournissent du lait dans des environnements où il n'y a rien de comestible pour les humains. La viande de chameau est excellente pratiquement sans cholestérol. Le poil de chameau sert à tisser les tentes et les tapis. Les chameaux sont de bons animaux de selle ; ils peuvent soit courir très vite sur une courte distance, soit parcourir d'interminables kilomètres sans donner de signes de fatigue. Les chameaux peuvent porter des charges, et ont été utilisés ainsi pendant des siècles comme moyen de transport du sel, de l'or et d'autres marchandises, là où n'existent pas d'infrastructures telles les routes et les pistes (LASNAMI, 1986).

Les scientifiques découvrent sans cesse de nouvelles caractéristiques qui viennent conforter la conviction fermement détenue par tous les éleveurs de chameaux : Les chameaux sont les animaux les plus nobles sur terre (Références électroniques 1, 2006).

2. Lait de chamelle

Le lait de chamelle fourni aux gens du désert les vitamines nécessaires à la vie telle que la vitamine C et la niacine. Ce qui est important vu que les fruits et légumes frais manquent dans ces régions. Il est considéré par les gens du désert comme un aliment complet dont on peut se contenter pendant des semaines. Il est bénéfique pour le foie et donne un joli teint aux femmes (Références électroniques 1, 2006)

Le lait de chamelle présente des caractéristiques originales. Il présente la particularité d'être léger, laxatif, très doux, généralement opaque et blanc, il a un goût sucré et acide mais parfois peut être salé. Son pH est d'environ 6,5 à 6,7, sa densité se situe entre 1,025 et 1,032 alors que son point de congélation se situe entre $-0,56^{\circ}\text{C}$ et $-0,565^{\circ}\text{C}$ (MATI, 1992). Sa teneur en eau est d'environ 87 à 91 %. Il présente une faible teneur en lactose (environ 2,9 à 5,8 %). Il renferme autant de protéines que le lait de vache. Sa teneur en sels minéraux est élevée notamment en sodium, en potassium, en magnésium et en iode. Sa teneur en vitamine C est élevée: Elle est égale à 3,5 mg par 100 ml; le lait de chamelle est celui à la teneur la plus élevée de toutes les espèces analysées (bovien, caprin). Il constitue donc un apport nutritionnel important dans les régions arides et semi-arides où les fruits et les végétaux contenant cette vitamine sont rares (MATI, 1999). Même acidifié, le lait de chamelle ne coagule pas, ce qui rend sa digestion aisée et le rapproche du lait humain. La matière grasse est très difficile à séparer vu la taille réduite des globules gras.

La production laitière est variable, mais on peut citer comme production moyenne 5 à 10 l par jour pendant 12 à 18 mois. Cette production varie aussi d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. A la différence des vaches, les chamelles ne stockent pas de lait dans la mamelle, et au moment de la traite toute distraction peut arrêter complètement le lait. Les chamelles sont un peu capricieuses, et donneront plus de lait si elles connaissent et apprécient la personne qui les traite.

La concentration du PP3 dans le lait camelin est supérieure à celle du lait bovin soit 1,1g/l contre, 300mg/l (GIRARDET, 2000). D'après ELDJNABI *et al* (1990), in GUERRADI, (1998), le lait du dromadaire peut se conserver à l'état cru pour une durée plus longue que la durée de conservation du lait des autres mammifères, du fait qu'il est riche en anticoagulant, en bactéricides, et en bactériostates, qui ralentissent et inhibent la prolifération des micro-organismes dans le lait, d'où l'on conclut que le lait de dromadaire peut être d'une qualité microbiologique très bonne.

Cette richesse nutritionnelle du lait du dromadaire, fait de lui un aliment thérapeutique très précieux et très apprécié par les peuplades du sud.

3. Les protéose- peptones

L'appellation « protéose-peptones » donnée par ROWLAND (1938), in MATI, (1992) désigne, la fraction des protéines du lait, soluble après traitement thermique à 95°C pendant 30 min suivi d'une acidification à pH 4,6.

Se référant à cette définition, certains auteurs désignent aussi les protéose-peptones par les termes " Acid stables, heat stable polypeptides " (PEARCE, 1980 ; RAMOS *et al*, 1988 ; ALICHANIDIS et MICHAELIDOU, 1990, in MATI, 1992).

Cette fraction représente dans le lait bovin, 2 à 4 % des protéines lactiques totales et 10 à 20 % des protéines sériques.

La séparation électrophorétique des protéose-peptones a révélé, depuis les travaux de LARSON et ROLLERI (1955), in MATI, (1992), l'existence de 3 composants importants de mobilités croissantes. Il s'agit des composants 3, 5 et 8, désignés respectivement par les abréviations PP3, PP5 et PP8.

L'Association Américaine des Sciences du lait a proposé de remplacer les termes : PP5, PP8 " S " (Slow) et PP8 " F" (Fast) par respectivement β -CN-5P, β B-CN-1P et β -CN-4P (EIGEL *et al*, 1984 ; in MATI, 1992). Cette dernière appellation distingue ces constituants selon leurs proportions respectives en résidus sérine phosphorylés. Elle a été établie suite aux travaux d'ANDREWS (1978) et EIGEL et KEENAN (1979), in MATI, (1992), qui ont montré que ces composants correspondent à des fragments de la caséine β libérés dans le sérum par l'action de protéases natives du lait.

3.1. Le composant 3 des protéose-peptones

3.1.1. Caractéristiques

Le composant 3 a été défini comme une phosphoglycoprotéine hétérogène dont la composition est faible en acides aminés aromatiques et en méthionine et présentant peu ou pas de cystéine (NG *et al*, 1970 ; KESTER et BRUNNER, 1982 ; PAQUET et ALAIS, 1982 ; in MATI, 1992).

Le PP3 se caractérise surtout par son hydrophobicité élevée. Cette propriété est mise d'ailleurs à profit pour son isolement (PAQUET *et al*, 1985 ; in MATI, 1992).

3.1.2. Origine

Le PP3 semble constituer une protéine native présente uniquement dans le lactosérum (KOLAR et BRUNNRE, 1970 ; ANDREWS et ALICHNANIDIS, 1983 ; in MATI, 1992).

La question de l'origine de ce composant ne semble pas définitivement réglée. En effet, si BRUNNR et THOMPSON (1961), in MATI, (1992) ont émis l'hypothèse que cette protéine pourrait provenir de la membrane des globules gras du lait, KOLAR et BRUNNER, (1969), in MATI, (1992) eux, postulent pour une origine sanguine.

KESTER et BRUNNER (1980, 1982), in MATI, (1992), montrent que la fraction glycoprotéique des protéose-peptones contenant le PP3 et la fraction glycoprotéique soluble de la membrane des globules gras contiennent un composant antigénique similaire.

NEJJAR *et al.* (1986), in MATI, (1992), confirment ces observations et notent en plus l'existence de réactions antigéniques entre le PP3 et le sérum sanguin bovin.

3.1.3 Propriétés

Les protéose-peptones sont caractérisées par des propriétés fonctionnelles importantes qui rehaussent leur intérêt. Il s'agit notamment des propriétés de moussage du lait (ASCHAFFENBURG, 1946 ; JEJEN *et al.*, 1973, in MATI, 1992), de tensio-activité (SHHIMZU *et al.*, 1989, in MATI, 1992) et surtout de régulation de la lipolyse spontanée du lait (ANDERSON, 1981 ; CARTIER et CHILLIARD, 1986 ; CARTIER *et al.*, 1990, in MATI, 1992).

Il semble maintenant établi que ces propriétés soient inhérente au PP3, plus qu'à tout autre composant. En effet, PAQUET (1986), in MATI, (1992), dans une étude comparative constate un pouvoir tensio-actif plus élevé par rapport à la fraction protéose-peptone totale (FPPT).

ANDERSON (1981), in MATI, (1992) montre clairement que seules les fractions de protéose-peptones enrichies en composant 3 possèdent un effet inhibiteur sur la lipolyse du lait.

4. Structure

Le PP3 comprend 135 résidus amino-acyls. Sa région N-terminale contient une insertion qui pourrait avoir 24 résidus amino-acyls qui semblerait contenir un site potentiel de O-glycosylation localisé dans l'insertion, ainsi que deux ou trois résidus sérine phosphorylés. Le PP3 fait partie de la famille des protéines de type GLYCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire glycosylation dépendante 1) et pourrait par conséquent jouer un rôle dans la défense immunitaire de la chamelle et du chameau (GIRARDET, 2000).

Matériel d'étude

II. Matériel d'étude

1. Lait camelin

Dans ce travail, nous avons utilisé deux échantillons de lait camelin provenant de chamelles, en bonne santé pâturant dans les parcours de la région de Ouargla. Le premier prélèvement de lait a été réalisé le 23 Mars 2006, et le deuxième le 05 Mai 2006. Les échantillons sont acheminés au laboratoire puis conservés dans le réfrigérateur.

Le premier échantillon est utilisé pour l'isolement des germes endogènes et exogènes du lait camelin. Le deuxième échantillon a servi au suivi l'évolution des lactobacilles et des entérobactéries pathogènes, de même qu'il est utilisé pour tester l'effet inhibiteur du PP3 sur les différents groupes des germes préalablement, isolés à partir du lait et cultivés sur des milieux sélectifs.

2. Poudre de lait écrémé « Low heat »

Ce lait est utilisé dans le présent travail comme lait de référence puisqu'il est garanti sans antibiotiques. Il provient de la firme DANONE.

3. Protéose- peptone 3

L'isolement et la purification du PP3 ont été réalisés au niveau du Laboratoire des Bio-Sciences des Aliments, LBSA. Université Poincaré, NANCY I, par chromatographie FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) à partir du lactosérum de lait camelin. Après l'extraction et purification, il est dialysé contre eau distillée (avec changement biquotidien) additionné d'azide (NaN_3) puis lyophilisé, et conservé à 4° C.

4. Milieux de culture

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle les microorganismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire aux exigences nutritives du microorganisme étudié, ce qui implique qu'il couvre les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance et qu'il apporte la source de carbone et d'azote et de l'énergie. Il doit présenter un pH voisin du pH optimal de la croissance de l'espèce considérée (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

4.2. Milieu CHAPMAN

Son pouvoir inhibiteur est obtenu par de forte concentration de chlorure de Sodium (7,5% au 75g.l⁻¹) qui sélectionnent les microorganismes halophiles parmi lesquels figurent les *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, certaines levures et même de rares bacilles Gram -. Il donne une indication de l'action de la souche isolée sur le mannitol ; l'utilisation de mannitol avec production d'acide se traduit par un virage du rouge au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu (GUIRAUD, 1998).

L'espèce *Staphylococcus aureus* forment des colonies entourées d'un halo jaune du à l'utilisation du mannitol (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

Ce milieu prêt à l'emploi provient de l'institut Pasteur d'Alger. Composition est indiquée en annexe 01.

4.3. Milieu VRBG

Le milieu Gélose à la bile au cristal de violet et au glucose ou milieu VRBG, est utilisé pour le dénombrement des entérobactéries (ANONYME, 1995) et (LARPENT, 1997).

Ce milieu prêt à l'emploi provient de l'institut Pasteur d'Alger. Sa composition est indiquée en annexe 02.

4.3. Milieu HEKTOEN

Cette milieu utilisé pour le dénombrement des entérobactéries pathogènes (ANONYME, 1980). C'est une gélose de base nutritive plus riche et contenant trois glucides (lactose, saccharose, salicine), du bleu bromothymol (BBT) comme indicateur de pH, de la fuchsine acide qui se colore en présence d'aldéhyde, des ions de fer III. Les bactéries catabolisant un glucide (ou plus) donnent des colonies saumon (comme *Echerichia*, *Levinea*, *Citrobacter* ...), cette coloration est due à l'interférence entre le BBT et la fuchsine. Un précipité de sels biliaires est fréquemment associé. Les bactéries ne catabolisant aucun des glucides donnent des colonies vertes ou bleues sans précipité (comme *Salmonella*, *Shigella* ...). (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

La gélose HEKTOEN contient une concentration élevée en sels biliaires qu'inhibe la croissance des bactéries Gram + et retarde la croissance de beaucoup de souche coliformes.

Ce milieu prêt à l'emploi provient de l'institut Pasteur d'Alger. Sa composition est indiquée en annexe 03.

4.4. Milieu Désoxycholate lactose-gélose

Utilisé pour le dénombrement des coliformes en microbiologie alimentaire, des *Enterococcus* peuvent être cultivés sur ce milieu, les colonies qui apparaissent sont des colonies des Gram -. Ce milieu contient désoxycholate qui n'inhibe pas les bactéries à Gram -, et inhibe les bactéries à Gram + (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

Ce milieu prêt à l'emploi provient de l'institut Pasteur d'Alger. Sa composition est indiquée en annexe 04.

4.5. Milieu MRS

Le milieu Man, Rogosa et Sharpe est utilisé pour le dénombrement des lactobacilles (LARPENT, 1997).

Ce milieu prêt à l'emploi provient de l'institut Pasteur d'Alger. Sa composition est indiquée en annexe 05.

Méthodes analytiques

III. Méthodes Analytiques

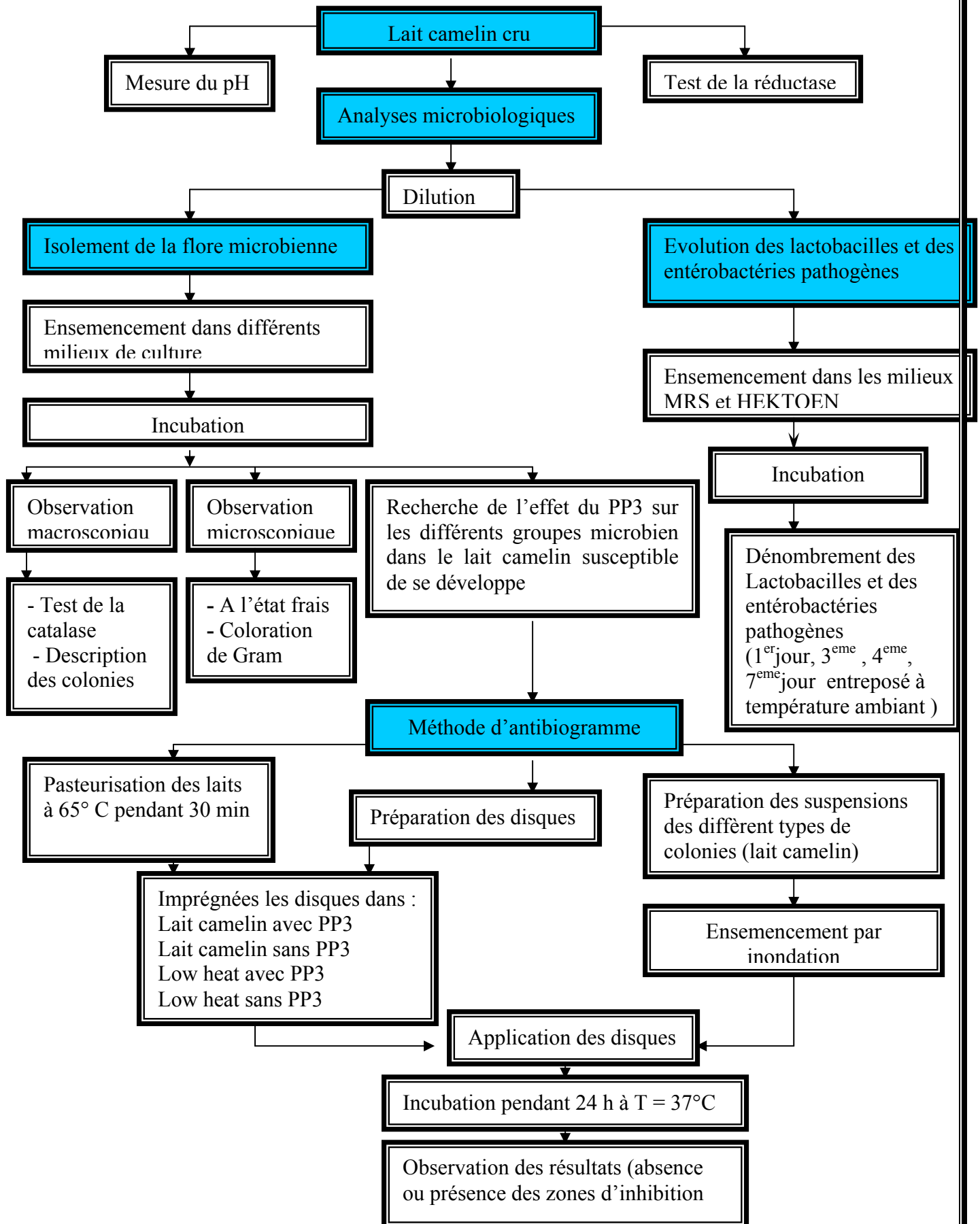


Figure 1 : Méthodes Analytiques

1. Mesure du pH

La mesure du pH permet d'estimer le niveau de biomasse microbienne. Un développement microbien entraîne fréquemment une variation du PH du milieu qui est liée à une production d'acides ou de produits alcalins, ou aux échanges ioniques (GUIRAUD, 1998). Le pH-mètre utilisé (WTW PH 325) est préalablement étalonné.

La technique est indiquée en annexe 06.

2. Analyses microbiologiques

2.1. Test de la réductase

Le test de la réductase sert à estimer la charge microbienne du lait (GUIRAUD, 1998). Son principe est basé sur la décoloration du bleu de méthylène due au métabolisme bactérien la rapidité de la décoloration est directement proportionnelle au nombre de germes présents. La majorité des micro-organismes, est en effet, capable, en se multipliant, de modifier le potentiel d'oxydoréduction du lait de façon suffisante pour transformer le bleu de méthylène en son leuco-dérivé incolore, (LARPENT, 1997).

Leur technique est indiquée en annexe 07.

2.2. Etude de la flore microbienne

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain. Lorsque le lait est contaminé, il peut contenir des germes exogènes pathogènes ou non. Il s'agit essentiellement des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores, (LARPENT, 1997).

Nous avons procédé dans cette étude à l'ensemencement et au dénombrement des différents groupes susceptibles d'évoluer dans des échantillons de lait entreposés à la température ambiante.

On ne tient compte que des boîtes contenant un nombre convenable c'est-à-dire compris entre 30 et 300 colonies par boîte (GUIRAND et GALZY, 1980 ; LEVEAU et ROUX, 1981 ; NICKLIN *et al*, 2000) pour cela il est nécessaire de procéder à des dilutions de l'échantillon de lait (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

Le technique de dilution est indiquée en annexe 08.

- Ensemencement

Chaque bactérie vivant dans l'échantillon de lait donne une colonie visible après incubation. La température et la durée d'incubation est variable en fonction du groupe bactérien considéré. (Tableau I)

Tableau I : Milieux nutritifs et conditions de culture des différents groupes microbiens.

Groupe de microorganismes	Milieu de culture	Type d'ensemencement	Température et durée d'incubation
Halophiles	CHAPMAN	Surface	30°C/48h
Entérobactéries	VRBG	profondeur	37°C/ 24 à 48 h
Entérobactéries Pathogènes	HEKTOEN	profondeur	37°C/ 48 h
Coliformes	Désoxycholate lactose-gélose	profondeur	35°C/ 48h
Lactobacilles	MRS	Profondeur (Double couche)	35°C/ 72h

Nous avons utilisé 2 boîtes de pétri pour chaque dilution.

- Numération des colonies

Le dénombrement a été réalisé par comptage à l'œil nu. Il a concerné toutes les colonies qui se sont développées, quelque soit leur taille. Nous nous sommes aidés dans le présent travail d'une loupe d'un grossissement de 1,5 X (PETRANXIENE, 1981).

2.2.1. Culture de la flore microbienne

2.2.1.1. Culture des halophiles

Les halophiles sont tellement bien adaptés aux conditions salines qu'ils requièrent des quantités élevées de chlorure de sodium pour croître, tel que Le milieu hypersalé de CHAPMAN (Mannitol Salt Agar) (PRESCOTT *et al*, 2003).

Parmi les halophiles, on désigne les staphylocoques qui appartiennent à la famille des Micrococcaceae.

Les Staphylocoques sont des microorganismes qui peuvent végéter au niveau des téguments et des muqueuses de l'homme et de l'animal sans déterminer de lésion, ou qui peuvent, au contraire, provoquer des affections très variées: septicémie, infection cutanée, infection osseuse ou à localisation viscérale. Ce double comportement avait d'abord été attribué à l'existence des germes pathogènes.

Les Staphylocoques sont des cocci de 0,1 à 1 μ de diamètre. Ils se présentent isolés, en diplocoques, ou en amas réalisant l'aspect caractéristique en " grappe de raisin". Ce sont des germes Gram +, immobiles, ils ne forment pas de spores, catalase positif (catalase (+)), ils se développent facilement en aérobiose ou en anaérobiose.

Parmi les espèces pathogènes, figure l'espèce *Staphylococcus aureus*, isolée à l'état normal de la peau et du mucus nasal de l'homme. C'est un pyogène, qu'on isole très fréquemment des furoncles, ostéomyélite, suppurations diverses en particulier des plaies, des panaris, etc....Elle secrète une exotoxine complexe et une entérotoxine (PREVOT. 1961).

2.2.1.2. Culture des entérobactéries

La famille des entérobactéries (entérobactériaceae) regroupe de nombreuses espèces dont la plupart sont des hôtes normaux (commensaux) de l'intestin de l'homme et des animaux. Dans l'intestin terminal, ces bactéries représentent plus de 10% de la flore totale et la majorité de la flore intestinale aéro-anaérobie.

Chez l'homme l'entérobactérie intestinale prédominante est l'espèce *Escherichia coli*. Les entérobactéries sont très répandues dans la nature en raison de la contamination de l'environnement. Ce sont des contaminants alimentaires très fréquents. Certains sont dangereux et posent des problèmes au point de vue sanitaire.

Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles, Gram-, oxydase négative, catalase (+), asporulés. Ils réduisent les nitrates en nitrites. Ils sont anaérobies facultatifs (GUIRAUD, 1998).

2.2.1.3. Culture et dénombrement des entérobactéries pathogènes

Parmi les entérobactéries pathogènes, on cite les Salmonelles. Elles sont très largement répandues dans l'environnement ; tous les produits d'origine animale sont susceptibles d'en contenir. Le nombre de germes nécessaires pour provoquer une infection clinique est très faible (moins d'un par gramme).

Les Salmonella sont en générale considérées comme pathogènes bien que leur virulence et leur pathogénicité varient énormément: fièvres typhoïdes, salmonelloses systémiques, gastro-entérites, toxi-infections alimentaires (GUIRAUD, 1998).

2.2.1.4. Culture des Coliformes

Le groupe des coliformes du lait est formé par les bactéries aérobies et anaérobies facultatives, Gram-, asporulées, capables de fermenter le lactose avec production de gaz. Les membres du groupe sont les bactéries d'origine fécale ou non fécale. (ANONYME, 1961).

Le groupe des coliformes comprend, *Escherichia coli*, *Entérobacter aerogene* et *Klebsiella pneumoniae*. (PRESCOTT *et al*, 2003).

Les coliformes peuvent provoquer des intoxications alimentaires. On utilise parfois les coliformes comme flore indicatrice de contamination fécale (GUIRAUD, 1998).

2.2.1.5. Culture et dénombrement des Lactobacilles

Les lactobacilles font partie de la flore normale du corps humain, on les retrouve dans la bouche, le tractus intestinal et le vagin. Ils existent également dans les produits laitiers. Généralement, ils ne sont pas pathogènes.

Les lactobacilles contiennent des bâtonnets non sporulants et parfois des coccobacilles, Gram +, dépourvus de catalase. Ils sont généralement des anaérobies facultatifs ou microaérophiles, donnent de l'acide lactique comme produit de fermentation unique ou majeure et ont des besoins nutritionnels complexes. Ils se développent au mieux dans des milieux légèrement acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4 (PRESCOTT *et al*, 2003).

2.2.2. Observations macroscopiques

2.2.2.1. Description des colonies

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen à effectuer. Il concerne la description de l'aspect des colonies, qui dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation.

Il ne pourra être réalisé convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments à savoir :

La taille : peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies, ou en comparant la taille de la colonie au le diamètre du champ.

La forme : vue en coupe (bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé...).

vue par-dessus (ronde, à bords dentelés, en étoile...).

L'aspect de la surface : peut être lisse ou rugueuse, renvoyer la lumière de façon à donner aux colonies un reflet métallique ou un aspect irisé.

L'opacité : Les colonies sont dites :

-Opaques si elles ne laissent pas passer la lumière.

-Translucides si elles laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers.

-Transparent si elles laissent passer la lumière et on voit les formes au travers.

La consistance : au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses, sèches ou encore muqueuses.

La couleur (pigmentation) : Les colonies habituelles sont de couleur crème, une couleur est due à des pigments (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

2.2.2.2. Test de catalase

La catalase est une enzyme contenant un noyau appartenant au groupe des cytochromes (hèmes transporteurs d'électrons) et un atome de Fe^{3+} , elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La réaction catalysée est la suivante : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$.

La plupart des microorganismes aérobies possèdent une catalase, en particulier presque tous les bacilles Gram-, son absence est donc un critère d'identification intéressant, les coques Gram + sont divisés en deux grands groupes catalase positif (catalase (+)) (Staphylococcus, Micrococcus) ou catalase négatif (catalase (-)) (Enterococcus, Lactococcus...), Lactobacillus et Erysipelothrix sont les seuls groupes des bacilles Gram +, aérobies, non sporulés dépourvus de catalase. (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

La technique du test de la réductase est indiquée en annexe 09.

2.2.3. Observation microscopique

2.2.3.1. Examen à l'état frais

Cette méthode est très simple, ne produit aucune déformation des sujets examinés, permet d'observer avec une parfaite exactitude la forme et les mouvements des microorganismes. (PETRANXIÉNE, 1981).

Leur technique est indiquée en annexe 10.

2.2.3.2. Examen après coloration de Gram

La coloration de Gram, développée en 1884 par le médecin danois Christian Gram, est la méthode de coloration la plus largement utilisée en bactériologie. Ce procédé de coloration divise les bactéries en deux classes : Gram- négative (Gram-), et Gram- positive (Gram+). (PRESCOTT et *al*, 2003.).

La coloration de Gram se déroule en trois temps principaux :

- Le frottis, séché et fixé, est recouvert de violet de gentiane (cristal violet) phénique, toutes les bactéries prennent ce colorant. On recouvre alors de réactif de lugol (iode dans l'iodure de potassium).
- Ensuite , le frottis est soumis à l'action de l'éthanol (90-95%), l'éthanol dissolvant le violet de gentiane, permet la décoloration du cytoplasme de certaines bactéries dites Gram-, les bactéries à Gram+ restent violettes.
- Après lavage à l'eau, la préparation est recouverte d'un deuxième colorant (safranine ou Fuchsine basique phéniquée) qui recolore en rose les bactéries précédemment décolorées.

Au terme de ce processus, les bactéries à Gram- apparaissent roses et les bactéries Gram+ violet. Ce sont des différences de nature de la paroi qui sont la cause de cette différences de coloration : les bactéries Gram- ont une paroi plus fine que celle à Gram+, et de plus, elle sont riche en lipides (membrane externe de la paroi) dans lesquels l'éthanol est fortement soluble (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

Leur technique est comme suivant : (PETRANSXIENE, 1981; LAYRAL et JOFFIN, 2001).

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué durant une minute.
- Laver à l'eau distillée (non obligatoire).
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol durant 30 secondes.
- Laver à l'eau distillée (non obligatoire).
- Recouvrir la lame d'éthanol à 0,95 (95%) durant 10 secondes (d'autres techniques sont possibles).
- Laver rapidement et recouvrir la lame de fuchsine phéniquée, pendant 10 secondes si elle est concentrée ou 1 minute si elle est diluée.
- Laver à l'eau distillée.
- Observation après séchage à l'immersion (objectif X 100) et à pleine lumière.
- Les bactéries Gram + apparaissent violettes, les bactéries Gram – sont roses.

2.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

2.3.1. Définition des antibiotiques

Selon la définition donnée par WAKSMAN, 1941 (in ANONYME, 1985) un antibiotique est une substance produite par un microorganisme et qui a le pouvoir d'inhiber la croissance d'autres microorganismes et même de les détruire.

L'antibiose est le fait que la prolifération d'une première espèce microbienne puisse être mise en échec par une seconde espèce, celle-ci élabore donc des substances nuisibles à l'égard de celle-là : ce sont les bio-antibiotiques que l'on appelle maintenant antibiotiques tout court. Cette appellation risque de créer une confusion avec toute une série de produits ayant des propriétés antimicrobiennes et qui ne sont pas des antibiotiques au sens rigoureux du terme, comme par exemple les produits antibactériennes de synthèse, les antiseptiques et les désinfectants... (ANONYME, 1985). Le PP3 semble en faire partie (GIRARDET, 2000)

2.3.2. Antibiogramme (méthode des disques)

On l'appelle méthode de diffusion en gélose ou méthode des disques. A la surface d'un milieu gélosé contenu dans des boîtes de pétri, après ensemencement par le germe à étudié, on applique des rondelles (disques) de papier filtre stériles imprégnés de la substance à tester (antibiotique, PP3...). Ces substances (antibiotique ou autres) diffusent dans la gélose à partir des disques, de telle sorte qu'autour de chacun d'eux s'établit un gradient de concentration décroissant avec la distance par rapport au disque. Après 24 heures d'étuvage, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition (DUVAL, 1971).

Cette méthode est utilisée dans le présent travail pour vérifier l'activité antibactérienne du PP3, suspectée par certains auteurs (GIRARDET, 2000).

2.3.3. Technique d'antibiogramme (méthode des disques)

2.3.3.1. Isolement

Les différents groupes bactériens susceptibles de se développer dans le lait camelin et utilisés dans la présente étude, ont été isolés comme cité précédemment à partir du premier échantillon de lait camelin (tableau II).

Tableau II : Différents groupes bactériens utilisés

Milieu de culture	Type de colonie	Couleur de colonie
CHAPMAN	Halophiles	Colonies blanches
VRBG	Entérobactéries	Colonies rose clair
HEKTOEN	Entérobactéries pathogènes	Colonies vert foncés
MRS	Lactobacilles	Colonies blanches

Il s'agit des colonies blanches développées dans le milieu Chapman, des colonies roses claires (VRBG), colonies vertes foncés (Hektoen) et des colonies blanches (MRS).

2.3.3.2. Préparation de l'inoculum

On prépare une suspension bactérienne pour chaque type de colonie (JOFFIN et LAYRAL, 2001). A partir de la suspension mère qui contient environ 10^8 bactéries par millilitre, nous procédons à une dilution dans 5 à 10 cm³ d'eau physiologique (une anse de culture pour les bacilles Gram négatif et une goutte de culture délivrée à la pipette pasteur pour les Staphylococcus).

Le diamètre de la zone d'inhibition dépendant de l'inoculum initial. Cette densité doit être telle que la culture obtenue après incubation présente des colonies toutes isolées mais jointives.

En pratique :

- A partir de l'isolement, réaliser une suspension microbienne (10^8 bactéries par millilitre).
- Diluer la suspension :
 - Au 1/100 pour les Entérobactéries et autres bacilles Gram – de culture facile, Staphylococcus, Bacillus, Enterococcus... (Une anse dans 5 à 10 cm³ diluant.), la dilution peut être un peu importante si la souche donne de grosses colonies sur gélose ordinaire.
 - Au 1/10 pour les Streptococcus.

2.3.3.3. Ensemencement

L'ensemencement se fait par la technique d'inondation (JOFFIN et LAYRAL, 2001) :

- Inonder la boîte de pétri avec 1 ml de chaque inoculum dans leur milieu correspondant. Veiller à bien répartir la suspension en inclinant la boîte dans toutes les directions.
- Réaspirer minutieusement à la pipette l'excès de suspension en faisant attention de ne pas disperser les gouttelettes et contaminer l'environnement ou les mains de l'opérateur.
- Sécher les boîtes de façon à éliminer le film liquidien dans lequel l'antibiotique risque de migrer. Veiller à éviter toute contamination, le séchage se fait à l'étuve à 37°C durant 15 minutes.

Pour chaque milieu, nous avons effectué 2 répétitions (deux boîtes de pétri).

2.3.3.4. Application des disques

Préparation des disques

- Découper le papier filtre sous forme des petits disques de 5 mm de diamètre.
- stériliser les disques à 107 ° C pendant 30 min dans une boîte de pétri en verre.
- Imprégner les disques des différents lots de laits préalablement pasteurisés (65° C pendant 30min). Dans présente étude, nous avons utilisé 4 lots expérimentaux de laits (tableau III) :

Tableau III : Constitution de lots expérimentaux de laits

Lots n°	Lait et traitement	Abréviations
1	Lait écrémé reconstitué type" Low heat " sans PP3	LH S
2	Lait écrémé reconstitué type "Low heat" avec PP3	LH P
3	Lait camelin entier sans PP3	LC S
4	Lait camelin entier avec PP3	LC P

La poudre de lait écrémé type" Low heat" est garantie sans antibiotiques.

Les disques stériles de papier filtre sont placés à la surface de chaque milieu de culture ensemencé par le germe correspondant, après avoir été imprégnés de lait, en appliquant dessus une légère pression à l'aide d'une pince stérilisée (en veillant à ne pas chauffer les disques par la pince flambée). Un disque appliqué ne peut être déplacé. Les différents disques doivent être distants d'environ 30mm.

Dans chaque boîte de pétri nous avons placé 5 disques dont l'un au centre.

2.3.3.5. Incubation

Les boîtes sont placées retournées dans l'étuve et incubées pendant 24 heures à 37° C.

2.3.3.6. Observation

Si un halo clair apparaît autour d'un disque, il y a zone d'inhibition et le résultat est positif (+), si non le résultat est négatif (-) (JOFFIN et LAYRAL, 2001).

Deuxième partie

Résultats et DISCUSSIONS

1. Mesure du pH

1.1. Résultats

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau IV.

Tableau IV: Mesure du pH

	Echantillon 1	Echantillon 2
pH	5,37	5,96

1.2. Discussion

Le pH du lait est dépendant de sa richesse en phosphates, citrates et caséines ainsi que de l'état sanitaire de la mamelle. Il est également influencé par la force des acides présents dans le lait (MATHIEU, 1998). Par ailleurs, le lait camelin de par sa richesse particulière en acide ascorbique (Vitamine C), présente un pH plus faible que celui d'autres espèces (YAGIL *et al*, 1982).

Un développement microbien entraîne fréquemment une variation de pH du milieu qui est liée à une production d'acides (GUIRAUD, 1998). Le lait camelin frais a un pH compris entre 6,20 et 6,82 (ANONYME, 1995).

Les valeurs de pH obtenus lors de la présente étude, sont inférieures à celles rapportées par les ouvrages consultés, ce qui indique que dans les échantillons de lait camelin analysés, il y a eu développement des microorganismes, particulièrement les bactéries lactiques et donc production d'acide lactique. Il est à relever que le pH du premier échantillon est plus faible que celui du deuxième échantillon car la durée de son entreposage (jusqu'au jour où l'analyse a été effectuée) a été plus longue.

2. Analyses microbiologiques

2.1. Test de réductase

2.1.1. Résultats

Les résultats relatifs au test de réductase sont indiqués dans le tableau V.

Tableau V : Test de réductase

Échantillon de lait camelin	Temps de décoloration du bleu de méthylène	Qualité de l'échantillon de lait
1	1 heure et 30 minutes	insuffisante
2	5 minutes	Très insuffisante

2.1.2. Discussion

La décoloration du bleu de méthylène est due au métabolisme bactérien. Sa rapidité est proportionnelle au nombre de germes présents dans le lait (LARPENT, 1997).

La décoloration rapide de ces deux échantillons s'explique par la forte charge microbienne, le deuxième échantillon étant plus chargé que premier échantillon.

2.2. Observations macroscopiques et microscopique

2.2.1. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VI.

*** Le milieu CHAPMAN**

Les colonies apparaissent blanches, de petites tailles, rondes, catalase positive, entraînant un changement de couleur du milieu, du rouge au jaune.

Ces bactéries sont des cocci, isolés ou en diplocoques, Gram + (photo 1).

*** Le milieu VRBG**

Les colonies sont rose- claires, de différentes tailles, catalase positive, leurs cellules sont des bâtonnets, Gram - et très mobiles (photo 2).

***Le milieu HEKTOEN**

On a remarqué le développement de deux types de colonies:

- Colonies vert- foncés, catalase positive, leurs cellules sont petites, coccobacilles, Gram-, isolés et mobiles.

- Colonies couleur saumon, catalase positive, leurs cellules sont petites, coccobacilles, Gram- provoquant un changement de couleur du milieu (du vert à l'orange) (photo 3).

***Le milieu désoxycholate**

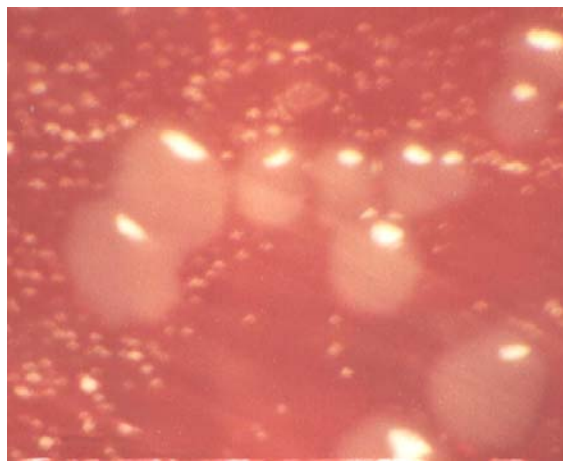
Donne des colonies rose-violettes, catalase positive, leurs cellules sont des bâtonnets, Gram - et mobiles (photo5).

***Le milieu MRS**

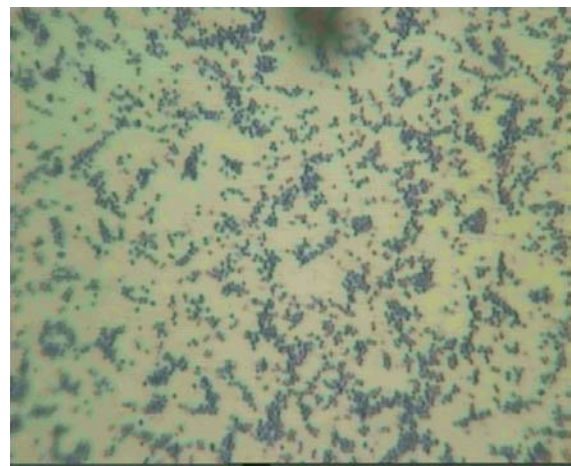
Donne des colonies blanches, catalase négative, leurs cellules sont des bacilles, Gram + et mobiles (photo4).

Tableau VI : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des colonies

Milieux de culture	Bactéries	Caractéristiques macroscopiques		Caractéristiques microscopiques	
		Aspect des colonies	Catalase	Aspect des cellules	Gram
CHAPMAN	Halophiles	-colonies blanches, petites tailles, rondes, plates, régulières, croissance en surface.	+	- cocci, isolés ou en diplocoques.	+
VRBG	Entérobactéries	- colonies rose claire, de petites tailles, semi bombées, ont centre surélevé, irrégulières, croissance en surface et en profonde.	+	-Bâtonnets, très mobiles	-
HEKTOEN	Entérobactéries Pathogènes	-colonies verte foncée, brillantes, centre foncé, régulières et de différentes tailles, -colonies saumon, bombées, irrégulières, de différentes tailles. Croissance en surface pour les deux types de colonies	+ +	-petites coccobacilles, isolés, mobiles. - petites coccobacilles.	-
Désoxycholate Lactose-gélose	Coliformes	-colonies rose-violette Croissance dans la zone intermédiaire	+	-bâtonnets, mobiles	-
MRS	Lactobacilles	-colonies blanches, rondes, bombées, de différentes tailles, irrégulières croissance en surface et en zone intermédiaire	-	- bacilles, mobiles, Isolés ou diploides.	+

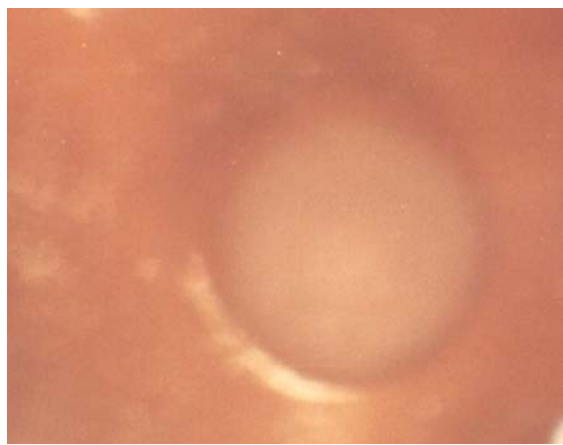


Colonies Blanches (6X3,5) (Original)

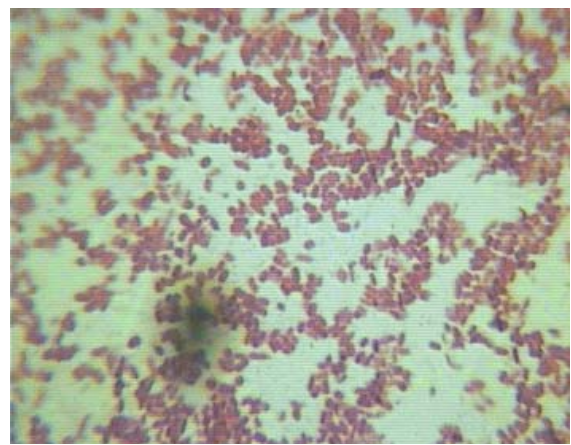


Cellules Gram+(X100) (Original)

Photo 1 : Halophiles

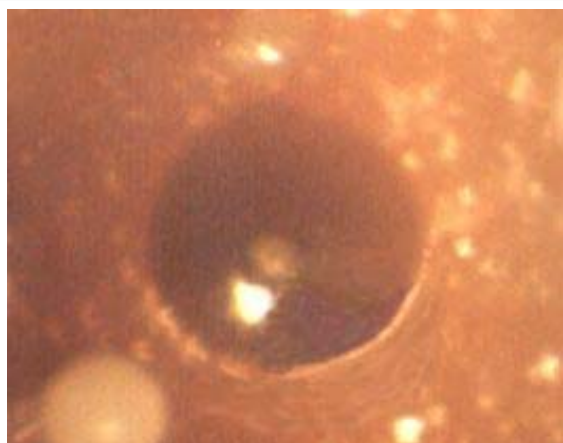


colonies rose claire (6X3,5) (Original)



Cellules Gram- (X100) (Original)

Photo 2: Entérobactéries

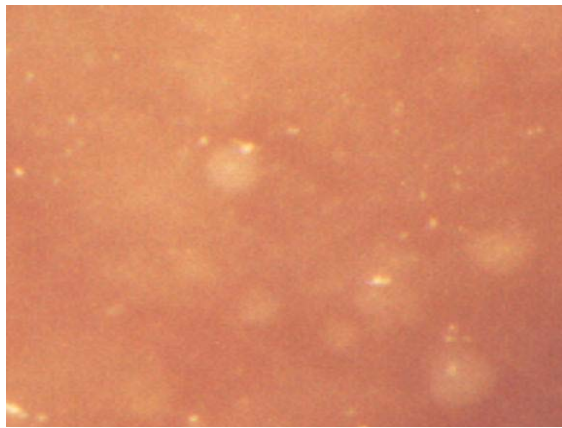


Colonies verte foncée (6X3, 5) (Original)

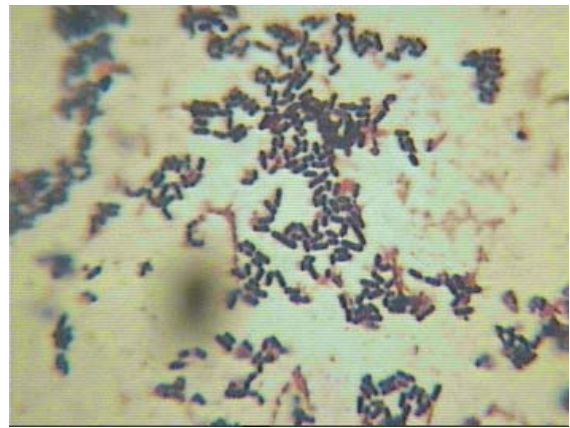


Cellules Gram- (X100) (Original)

Photo 3 : Entérobactéries pathogènes

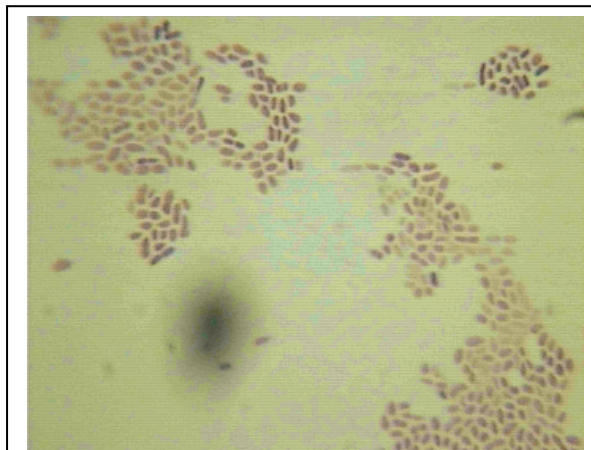


Colonies blanches (6X3,5) (Original)



Cellules Gram+ (X100) (Original)

Photo 4: Lactobacilles



Cellules Gram- (X100) (Original)

Photo 5: Coliformes

2.2.2. Discussion

La forte concentration de chlorure de sodium qui existe dans le milieu Chapman permet la sélection des bactéries halophiles. Ces colonies provoquent un changement de couleur du milieu au jaune. Ce changement de couleur du milieu est dû à l'utilisation du mannitol par les bactéries, ce qui nous permet de rattacher ces dernières au genre *Staphylocoque*.

Les colonies qui apparaissent dans le milieu VRBG (sélectif), sont des entérobactéries.

L'apparition de deux types des colonies dans le milieu HEKTOEN (sélectif), indique la présence des entérobactéries pathogènes.

Les colonies vert foncés seraient peut être des salmonelles ou des shigelles. Ces colonies ne changent pas la couleur du milieu, elles ne catabolisent donc aucun des glucides du milieu.

Les colonies couleur saumon pourraient appartenir aux genres *Escherichia*, *Levinia* ou *Citrobacter* etc... Elles entraînent le changement de la couleur du milieu en orange par leur catabolisme d'un glucide (ou plus) du milieu.

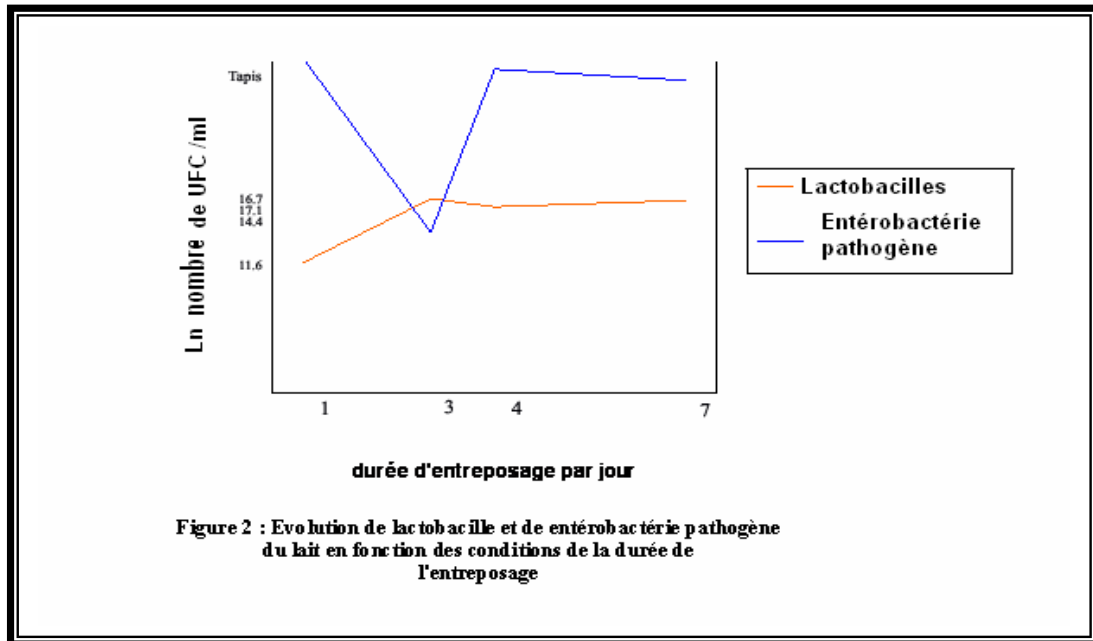
Le milieu désoxycholate lactose- gélose permet l'apparition des colonies qui indique la présence des Coliformes et laisse supposé que les échantillons de lait utilisés ont fait l'objet de contaminations fécales.

Enfin, les colonies qui apparaissent dans le milieu MRS, sélectif, sont des *Lactobacilles* faisant partie de la flore naturelle du lait.

2.3. Evolution des Lactobacilles et des Entérobactéries pathogènes du lait en fonction des conditions de la durée de l'entreposage

2.3.1. Résultats:

L'évolution des Lactobacilles et des Entérobactéries pathogènes durant un entreposage de 7 jours à la température ambiante (27°C en moyenne) est représentée sur la figure2.



2.3.2. Discussion

Le grand nombre de colonies d'entérobactéries pathogènes qui se sont développées dans le milieu sélectif HEKOEN dès le premier jour de l'entreposage au laboratoire, indique que l'échantillon de lait utilisés ont subi une forte contamination exogène. Le faible nombre de colonies de lactobacilles, permet de déduire que le PH du lait utilisé, n'était pas encore favorable pour leur croissance.

Au 3^{ème} jour, on remarque la diminution des colonies des entérobactéries pathogènes. Par contre, le nombre de colonies de lactobacilles augmente. Ce résultat peut être expliqué par l'aptitude des bactéries lactiques de produire des substances actives (comme l'acide lactique) qui jouerait un rôle bactériostatique vis à vis de la flore nuisible (MASCLE *et al*, 1988 in ABIDI, 2001). Cet effet bactériostatique entraînerait la diminution des entérobactéries pathogènes.

Au 4^{ème} et au 7^{ème} jours, on remarque la diminution du nombre de lactobacilles alors que celui des entérobactéries pathogènes augmente. On peut déduire que le lait ne possède plus les conditions favorables pour la croissance des lactobacilles au delà du quatrième jour de

l'entreposage (épuiement du milieu en lactose), et par conséquent la production des substances inhibitrices

actives par les lactobacilles est diminuée ou arrêtée, ce qui entraîne l'augmentation du nombre des entérobactéries pathogènes.

2.4. Recherche de l'effet du PP3 sur les différents groupes microbiens

Il est à relever que nous avons préparé une suspension bactérienne pour chaque type de colonie à partir d'une anse de culture introduite dans un (01) millilitre d'eau physiologique au lieu de 5 ou 10 ml, vu que la charge de la suspension mère était insuffisante, puis nous avons procédé aux ensemencements des différents milieux de culture comme indiqué précédemment.

2.4.1. Résultats:

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VII et VIII.

Tableau VII : Les résultats d'antibiogrammes

Types des Bactéries	Numéro De répétition	Lots expérimentaux de laits			
		LHS	LHP	LCS	LCP
Halophiles	1	+++--	+++--	-----+	+++++
	2	+-----	+++--	-++++	+++++
Entérobactéries	1	-----	+++++	+----	-----
	2	+-----	+----	+-----	++++-
Entérobactéries Pathogènes	1	+-----	-----	+-----	+----
	2	-----	+++--	-----	+----
Lactobacilles	1	-----	---++	-----	-----
	2	-----	-----	-----	-----

(+) Présence de zone d'inhibition (-) Absence de zone d'inhibition

Pour chaque boîte, il y a 5 signes (+ ou -).

Tableau VIII: Zones d'inhibitions observées dans les différents milieux (groupes bactériens) provoquées selon les lots expérimentaux de laits

Types des Bactéries	Nombres des zones d'inhibition (N.Z.I) (Somme des deux échantillons)			
	LHS	LHP	LCS	LCP
Halophiles	4/10	6/10	5/10	10/10
Entérobactéries	1/10	7/10	3/10	4/10
Entérobactéries pathogènes	1/10	3/10	1/10	4/10
Lactobacillus	0	2/10	0	0

(LHS) Lait Low Heat sans PP3

(LCS) Lait Camelin sans PP3

(LHP) Lait Low Heat avec PP3

(LCP) Lait Camelin avec PP3

. A partir de nos constatations, nous pouvons établir un tableau regroupant les résultats sous forme d'une analyse comparative de l'activité antibactérienne du PP3 (Nombres de Zones d'Inhibition « N.Z.I ») sur les différents groupes bactériens (tableau IX)

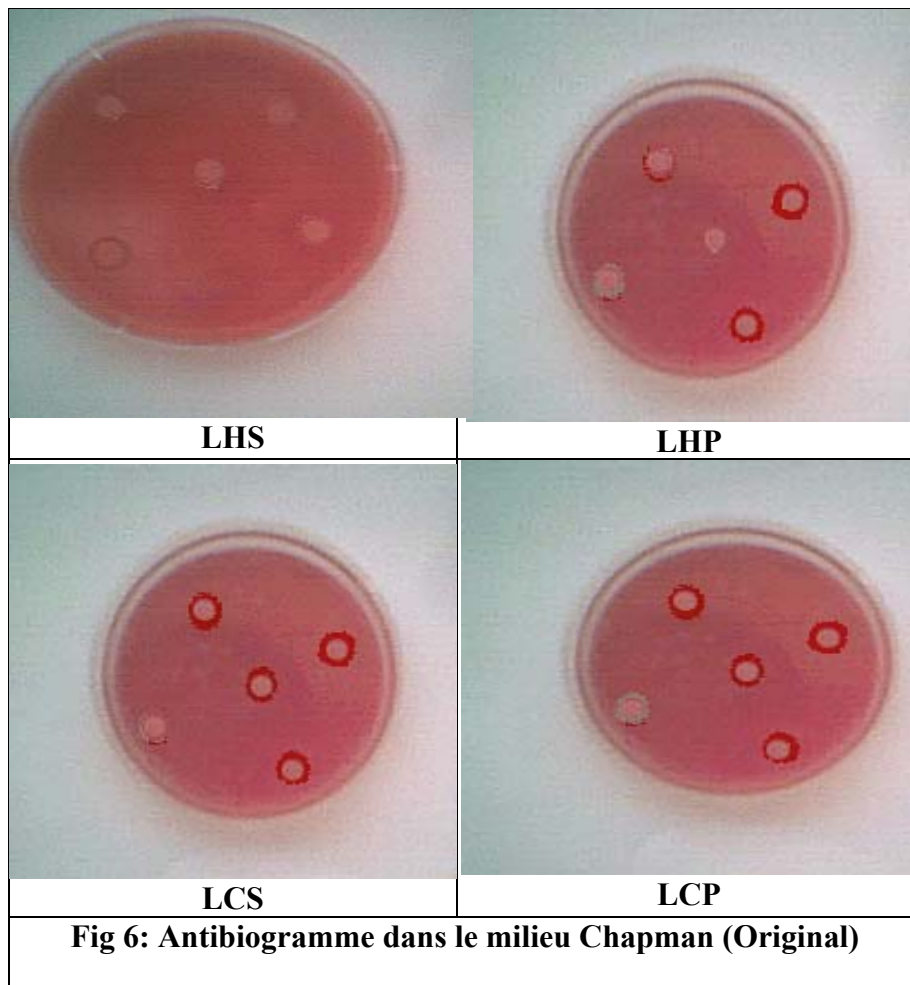
Tableau IX : Analyse comparative de l'activité antibactérienne du PP3 (N.Z.I) sur les différents groupes bactériens

Halophiles (Photo6)			
Type du lait	Comparaison du nombre de zones d'inhibition (N.Z.I)	Interprétation	
		Effet antibactérien de PP3	Effet synergique antibactérien du lait camelin (PP3+ d'autres composés actifs naturels)
LHS / LHP	N.Z.I du LHP est plus élevé que celui du LHS	Présent	-
LCS/ LCP	N.Z.I du LCP est plus élevé que celui du LCS	Présent	Présent
LHS / LCS	N.Z.I du LCS plus que celui du LHS	Absent	présent
LHP/ LCP	N.Z.I du LCP est plus élevé que LHP	présent	Présent
Entérobactéries (Photo7)			
LHS/ LHP	N.Z.I du LHP est plus élevé que celui du LHS	Présent	-
LCS / LCP	N.Z.I du LCP est plus élevé que celui du LCS	Présent	Faible effet
LHS / LCS	N.Z.I faible dans le cas du LCS et absent dans le LHS	Absent	Faible effet
LHP/ LCP	N.Z.I du LHP est plus élevé que celui du LCP	Présent	Absent
Entérobactéries pathogènes (Photo8)			
LHS/ LHP	N.Z.I du LHP plus élevé que celui du LHS	Présent	-
LCS/ LCP	N.Z.I du LCP est plus élevé que celui du LCS	Présent	Absent
LHS/ LCS	N.Z.I Absent	Absent	Absent

LHP / LCP	même N.Z.I	Présent	Absent
-----------	------------	---------	--------

Lactobacilles (Photo9)

LHS / LHP	Absence	Absence	Absence
LCS / LCP	Absence	Absence	Absence
LHS/ LCS	Absence	Absence	Absence
LHP/ LCP	Absence	Absence	Absence



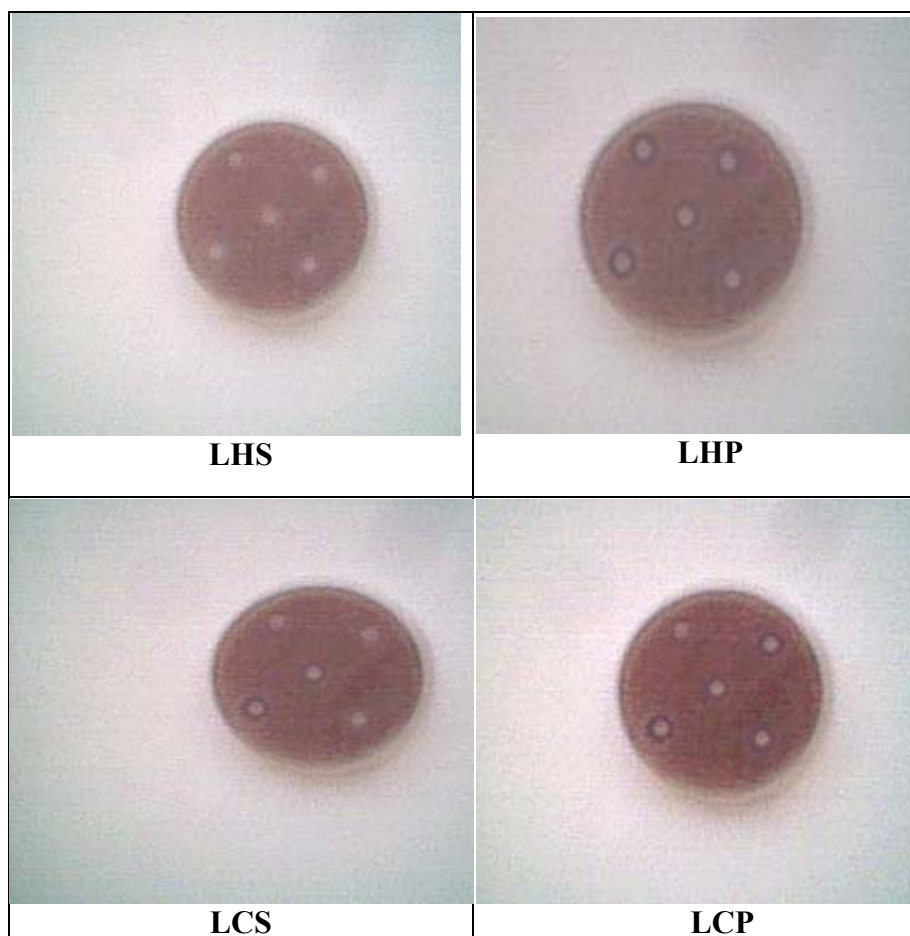
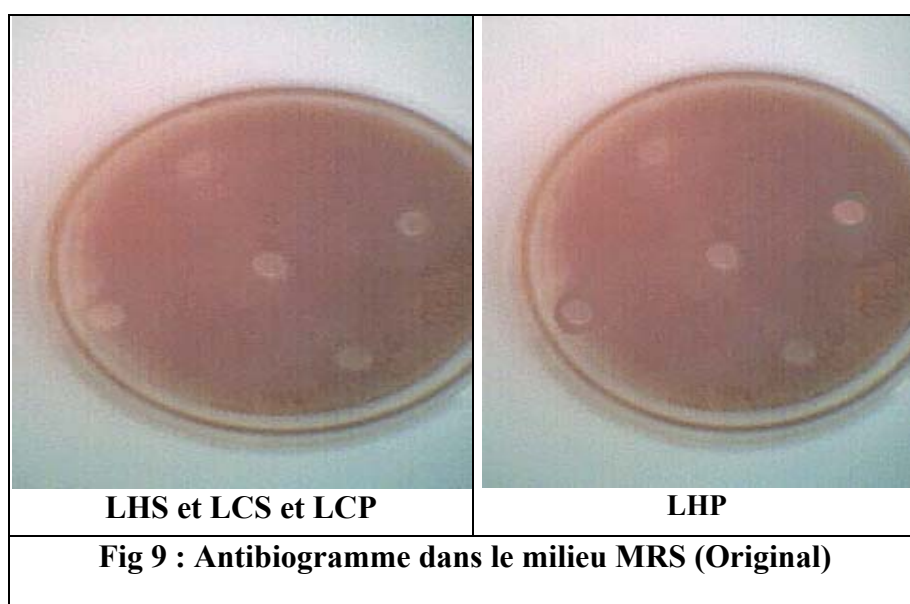
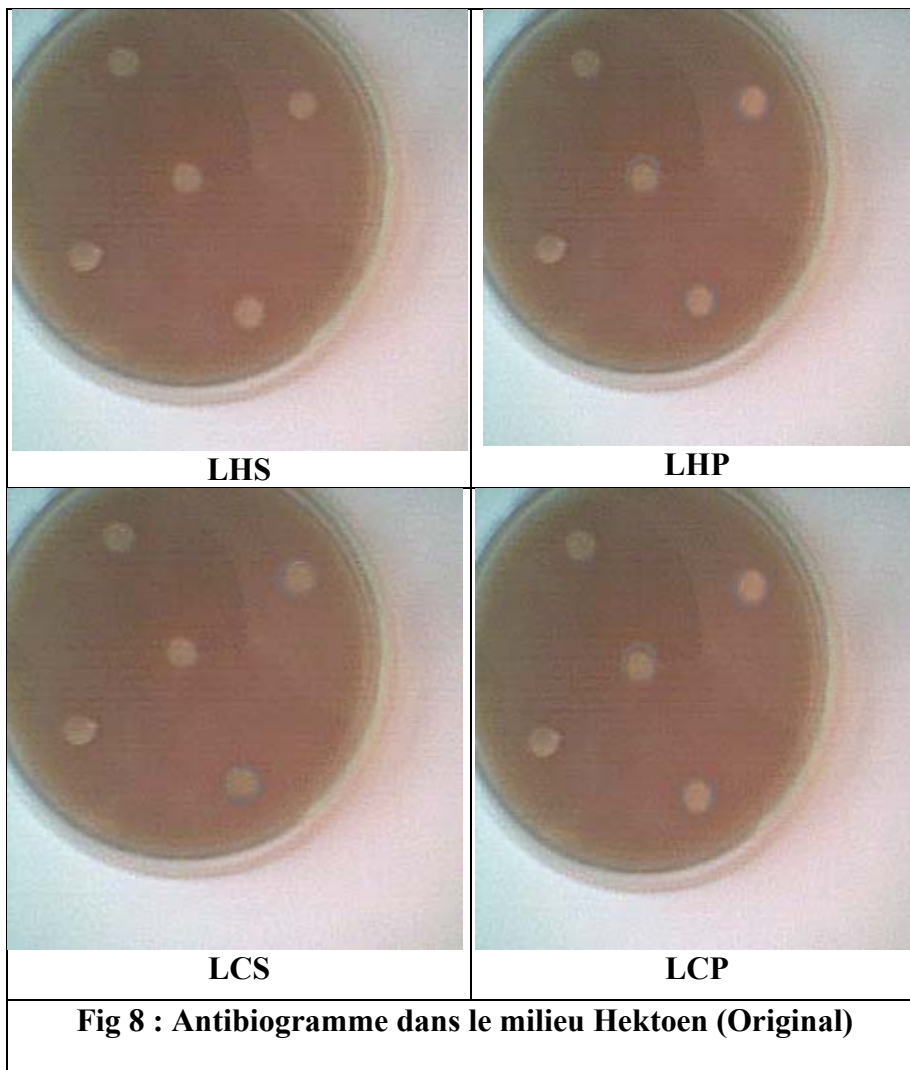


Fig7: Antibiogramme dans le milieu VRBG (Original)



2.4.2. Discussion et conclusion

Le PP3 appartient à la famille des Gly CAM-1 (Molécule d'Adhésion Cellulaire Glycosylation-dépendante 1), il pourrait par conséquent jouer un rôle dans la défense immunitaire de la chamelle et du chamelon du fait de l'existence d'un site potentiel de O-glycosylation, situé sur l'insertion de résidus amino-acyls à partir de l'extrémité N-terminale de la molécule (GIRARDET, 2000). L'existence d'une glycosylation dans une protéine (comme sur les molécules d'anticorps) constitue un moyen de reconnaissance de l'antigène.

Les résultats que nous avons obtenus semblent indiquer que le PP3 joue un rôle dans la défense immunitaire contre les bactéries exogènes. Cet effet antibactérien semble être inhibiteur ou létale.

L'absence de cet effet inhibiteur (cas du lait reconstitué type "Low heat" sans PP3) semble confirmer cette hypothèse. Le cas où le PP3 est présent et où la zone d'inhibition est absente (cas des germes endogènes: lactobacilles) peut s'expliquer par le fait que ceux-ci ne constituent pas un antigène, ils font partie de la flore naturelle du lait.

L'effet du PP3 semble être renforcé par la présence du système protecteur naturel du lait camelin (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase, immunoglobulines), puisque même en l'absence de PP3, quelques disques ont été entourés d'une zone d'inhibition.

Le Lait camelin est caractérisé par sa salinité qui favorise l'existence des halophiles, sa contamination par ce type de bactéries est inévitable si les conditions de la traite ne sont pas conformes. Ceci peut rendre le lait impropre à la consommation. Le rôle du PP3 dans ce contexte est très important car il semble posséder un effet épurateur naturel du lait camelin.

Le PP3 possède un effet antibactérien sélectif. Il inhibe la croissance des halophiles. Son effet contre les entérobactéries et entérobactéries pathogènes semble relativement plus faible, et il n'agit pas contre la flore banale du lait camelin (tels que les lactobacilles). Cet effet sélectif de PP3 pourrait s'expliquer par présence d'un seul site O-glycosylation ce qui diminue sa capacité de reconnaître plusieurs types de bactéries.

Discussion générale

Discussion générale

La présente étude indique la présence d'une diversité dans la flore bactérienne du lait camelin. Celle-ci se divise en :

- une flore de contamination tels que les entérobactéries, les entérobactéries pathogènes et les halophiles.
- une flore indigène tels que les lactobacilles et les streptocoques.

Les résultats que nous avons obtenus, se rapprochent de ceux de ABIDI (2001), DAOUD et GUESSEIR (2003).

L'étude de l'évolution des entérobactéries pathogènes et des lactobacilles montre l'existence d'un antagonisme entre les deux. Cet antagonisme semble être du à la sécrétion de substances actives par les lactobacilles (MASCLE *et al*, 1988).

ABIDI (2001), DAOUED ET GUESSEIR (2003) trouvent que le taux des lactobacilles augmente au fur et à mesure que la durée d'entreposage augmente, l'inverse est observé pour la flore de contamination.

Dans la présente étude, nous avons obtenus le même résultat jusqu'au 3^{ème} jour d'un entreposage à la température ambiante. Au delà du 4^{ème} jour, le taux de lactobacilles diminue, il pourrait s'agir d'un épuisement du milieu en substances nutritives (comme lactose), et le taux de germes de contamination augmente. L'arrêt de production de substances actives par les lactobacilles dont le nombre diminue entraîne l'augmentation des entérobactéries pathogènes.

Le lait camelin est connu par des substances antibactériennes naturelles comme le lysozyme (BARBOUR *et al*, 1984), la lactopéroxydase (ELAGAMY *et al*, 1992), la lactoferrine et autres protéines protectrices telles que les bactériocines produites par les bactéries lactiques (DESMAZEAUD, 1992). Selon GIRARDET *et al* (2000), le PP3 pourrait jouer un rôle dans la défense immunitaire de la chamelle et du chamelon. La présente étude, montre que le PP3 inhibe la croissance des germes halophiles, des entérobactéries, et des entérobactéries pathogènes, et qu'il est sans effet contre les lactobacilles. Ce qui semble rejoindre les résultats évoqués par GAILLARD *et al* (Références électroniques 2, 2006) concernant l'activité antibactérienne de PP3 contre les Gram + et les Gram -.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le dromadaire a la capacité exceptionnelle de transformer des maigres ressources alimentaires en protéines nobles tels que la viande et le lait dont la production est maintenue même pendant les périodes de restriction alimentaire et de déficit hydrique.

Le lait de chamelle présente, sans aucun doute, un intérêt particulier pour les nomades et les populations du sud, notamment pour ses vertus thérapeutiques.

Au point de vue apport alimentaire, ce lait est à classer parmi les produits ayant une grande valeur nutritive, concernant les nutriments de base (glucides, lipides, protides).

Ce lait se différencie par un taux plus élevé en vitamine C, en niacine, et par la présence d'un système protecteur puissant (lysozyme, vitamine C, lactopéroxydase, lactoferrine) qui permettent une longue durée de conservation naturelle du lait camelin, pendant quelques jours, sous des températures relativement élevées.

En plus de cette protection naturelle, il y a aussi le PP3 (GIRARDET *et al*, 2000) qui pourrait jouer un rôle dans la protection naturelle du chamelon (donc du consommateur)

La présente étude avait pour objectif de vérifier l'effet antibactérien du PP3. Les résultats obtenus sont de nature à suspecter le PP3 comme un élément faisant parti du système protecteur naturel du lait camelin par son effet inhibiteur ou létal contre les germes de contamination gram +, notamment les halophiles. De même, qu'ils semblent indiquer que l'effet inhibiteur du PP3 est relativement moins accentué en ce qui concerne la flore de contamination gram – (entérobactéries). Enfin, d'après la présente étude, le PP3 ne semble pas inhiber la flore originelle comme les lactobacilles.

On peut dire que ce système protège la chamelle, le chamelon et aussi le consommateur contre les attaques extérieures d'où l'originalité du lait de chamelle.

Après cette étude, on peut suggère pour les études prochaines d'utiliser du lait camelin écrémé parce que le PP3 se caractérise par son hydrophobicité élevée, donc il possède une grande affinité pour les globules gras du lait camelin. Car si le lait camelin est écrémé, le PP3 est libre dans le lactosérum et son effet est maximal.

Références bibliographiques et électroniques

Références bibliographiques

ABIDI K. (2001), Contribution à la connaissance du lait camelin : Étude de l'évolution de la microflore du lait entreposé à la température ambiante et à 4°C. Mémoire d'ingénieur, Ouargla, 59p

AIT ABDELOUHAB N. (2001), Microbiologie alimentaire, office des publications universitaires, Alger, 135p

ANONYME. (1986), Contrôle de la qualité des produits laitiers, analyses physiques et chimiques, AFNOR, Paris, 1986, p205.

ANONYME. (1991), Techniques de détection et de dénombrement des microorganismes du lait, 1991, p27.

ANONYME. (1985), Antibiotique, Encyclopaedia Universalis, Paris, 1193p.

AZZI M et BOUCETTA T. (1993), Contribution à l'étude du comportement alimentaire du dromadaire « *Camelus dromedarius* » en fonction de la saison (hiver, printemps) au Sahara septentrional (cas de la région d'Ouargla), diplôme d'ingénieur d'état en Agronomie SAHARIENNE), Ouargla, 26p.

BEERENS H et LUQUET FM. (1987) Guide pratique d'analyse microbiologique de lait et produits laitiers, technique et documentation, Paris, p76.

ANONYME (1980), produits et réactifs de laboratoire Bio-merieux MARCY-l'étoile France, p126.

CHEHMA A. (1999), Valeur alimentaire des sous-produits du palmier dattier chez le dromadaire, Séminaire sur la recherche cameline, Ouargla, Pp 65-76.

**DAOUD A et GUESSEIR S. (2003), Contribution à la mise en évidence de l'activité antibactérienne naturelle du lait camelin : Evolution de différents groupes bactériennes pathogènes dans un lait soumis à une fermentation spontanée, Mémoire d'Etudes Supérieures
En biologie, Ouargla, Pp 65-76.**

DESMAZEAUD M. (1996), les bactéries dans l'alimentation humaine : utilisation et innocuité, Pp 34 – 331.

DUHAIMAN A.S. (1988), Purification of camel milk lysosyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*, composition, biochemistry and physiology, Pp796-7933.

DUVAL. (1971), Mise en évidence de l'activité antibiotique, paris, p288.

ELAGAMY E.S.I, RUPPANNER R, ISMAIL A, CHAMPAGNE CP and ASSAF R. (1992), Antimicrobial and Antiviral activity of camel milk protective proteins. Journal of dairy research, Pp 177-180.

ELAGAMY ESI, RUPPANNER R, ISMAIL A, CHAMPAGNE CP and ASSAF R. (1996), Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxydase, lysozyme and immunoglobulines from camel's milk. International diary journal, Pp 129-145.

ELSOHL N. (1985), Staphylocoques, Encyclopaedia Universalis, France S-A, 1985, p154.

GIRARDET J.M, SAULNIER F, GAILLARD JL, RAMET JP and HUMBERT G. (2000), camel (*camelus dromedarius*) milk pp3 : evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein, Rev, biochem. Cell biol, vol 78, Pp 19-25.

GNAN S.O, MOHAMED MO, SHERHA AM and FGWEBE AO. (1994), Antimicrobial activity of camel's milk. Acte de colloque, 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie, collection colloques (CIRAD), Pp 185-187.

GUERRADI M. (1998), Contribution à la détermination de la composition et la caractérisation physicochimique du lait de la chamelle –NAGGA-, Thèse d'ingénieur d'état en agronomie Saharienne, Ouargla, 57p.

GUIRAND J et GALZY P. (1980), Analyses microbiologiques en industries alimentaire, Edition l'Usine Nouvelle, p72.

GUIRAUD JP. (1998), Microbiologie alimentaire, Edition : DUNOD, 615p.

KAMOUN M. (1988), Nutrition et croissance (production de viande cameline, Séminaire sur la digestion, la nutrition et l'alimentation du dromadaire, Ouargla, Pp1-8.

JOFFIN JN et LEYRAL G. (2001), Microbiologie Technique 1, Dictionnaire des technique, 3^{eme} édition, France, 314 p.

LARPENT J.P. (1997), Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire, 1041p.

LARPENT J.P. (2000), Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, Technique et documentation, Paris, 276p.

LASNAMI K (1986), le dromadaire en Algérie perspectives d'avenir, Magister en sciences agronomiques, Alger, p11.

LEVEAU J.Y., ROUX M. (1981), Technique rapides de contrôle en industries agroalimentaire, IAA N°10, p212.

MATHIEU J. (1998), Initiation à la physicochimie du lait, Technique et documentation, France, p257.

MATI A. (1992), Les protéose-peptones dans les laits bovin, ovin et caprin: Isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction a caractère hydrophobe contenant le composant-3, Thèse pour obtenir le titre docteur de l'université NANCY I en biochimie appliquée, 201p.

MATI A. (1999), Le lait de chamelle Etat des caractérisation par rapport du la bovin: Aptitudes à la conservation et à la transformation, Séminaire sur la recherche cameline, Ouargla, Pp 123-128.

NICKLIN J, GRAEME K, COOK, BAGET T et KILLI ILNGTON R. (2000) Essentiel en microbiologie, édition Berti, Paris, p362.

PETRANSXIENE D. (1981), Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers, deuxième édition, Paris, 221p.

PRESCOTT L.M, HARLEY D.A, et KLEIN D.A. (2003), Microbiologie, deuxième édition, Paris, 1136p.

PREVOT A.R. Traite de systématique bactérienne-2, DUNOD, Paris, 735p.

RAMET. (1994), les aspects scientifiques et technologiques particulier de la fabrication de fromage au lait de dromadaire ; in dromadaire et chameaux animaux laitier. Acte de colloque 24-26 octobre 1994. Nouakchott, CIRAD, montpellier, 1998. Pp 241-255.

Références électroniques

Références électroniques 1, www.tiviski.com/ le chameau. Htm. 2006.

Références électroniques 2, www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.2006.

Annexes

Annexe 01

Milieu Chapman (milieu prêt à l'emploi LARPENT, 1997)

- Extrait de viande.....	01g.
- Peptone	10g.
- Chlorure de Sodium (NaCl)	75g.
- Mannitol.....	10g.
- Rouge de phénol	0,025g.
- Agar	11 à 18g.
- Eau distillé	1000ml.

Annexe 02 :

Milieu Gélose à la bile au cristal de violet et au glucose (violet Read bile dextrose Agar)

V.R.B.G (LARPENT ,1997)

- Peptone.....	07g
- Extrait de levure.....	03g
- Sels biliaires.....	1,5g
- Glucose.....	10g
- Charbonne de sodium.....	05g
- Rouge neutre.....	0,03g
- Cristal de violet.....	0,002g
- Gélose.....	08 à 18g
- Eau distillé.....	1000ml

Ajuster le pH 7,4 à 25c°

Annexe 03 :

Milieu Hektoen : (LARPENT, 1997)

- Protéase de peptone.....	12g
- Extrait de levure.....	03g
- Charbonne de Sodium.....	05g
- Thiosulfate de Sodium.....	05g
- Sels biliaires.....	09g
- Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
- Salicine.....	02g

- Lactose.....	12g
- Saccharose.....	12g
- Fuchsine Acide.....	0,1g
- Bleu de bromotymol.....	0,065g
- Agar.....	13g
- Eau distillé.....	1000ml

Ajuster le pH 7,4

Annexe 04

Le milieu Désoxycholate lactose-gélose (BIOMERIEUX, 1980)

- Bio-polytone.....	10g
- Lactose	10g
- Chlorure de Sodium.....	05g
- Citrate de Sodium.....	02g
- Désoxycholate.....	0,5g
- Rouge neutre.....	0,0033g
- Gélose.....	15g
- Eau distillé.....	1000g

Annexe 05

Le milieu MAN, ROGOSA et SHARP (MRS) (BEERENE et LUQUET, 1987)

- Protéase peptone.....	10g
- Extrait de bœuf	10g
- Extrait de levure.....	05g
- Glucose.....	20g
- Tween.....	20g
- Citrate d'Ammonium.....	02g
- Acétate de Sodium.....	05g
- Sulfate de Magnésium.....	0,1g
- Sulfate du Manganèse.....	0,05g
- Phosphate de potassium.....	02g
- Gélose de touzart et matinon.....	12g
-- eau distillé.....	1000ml

Annexe 06

Mesure du pH : (AFNOR, 1986)

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH-mètre. La valeur est lue directement sur l'écran de l'appareil.

- Dans un bécher de 100 ml, où étalonne l'appareil avec la solution tampon d'étalonnage.
- Après standardisation du pH-mètre, on introduit l'échantillon du lait dans un bécher de 100ml bien lavé à l'eau distillé, aussi que l'électrode.
- Le résultat est donné après l'introduction l'électrode dans l'échantillon.

Annexe 07

Teste de la réductase

1-Technique:(LARPENT, 1997)

- Homogénéiser l'échantillon par 25 agitations manuelles successives.
- En placer 10ml de l'échantillon, aseptiquement, dans un tube stérile fermé par un bouchon stérile.
- Ajouter alors 1ml d'une solution standardisé de bleu de méthylène à 5mg pour 100ml d'eau.
- On le retourne une ou deux fois pour obtenir un mélange homogène du lait et du colorant.
- Placer dans un bain d'eau à 37°C et noter le temps de cette immersion.(le niveau de l'eau du bain d'eau doit être supérieur à celui du lait dans le tube).

2-Interprétation: (LARPENT, 1997)

Décoloration en	Nombre de bactéries par ml	Qualité du lait
5 heures ou plus	100000 – 200000	Bonne
2 à 4 heures	200000 à 2 millions	Bonne à passable Insuffisante
Moins de 2 heures	2 à 10 millions	Insuffisante

Annexe 08

Préparation de la dilution : (PETRANSCSIÉNE, 1981).

- A l'aide de la pipette de 10 ml, prélever et introduire 9 ml de diluant dans chacun des 4 tubes.
- Homogénéiser convenablement le produit a examiné (lait)
- Puis, a l'aide d'une pipette de 1 ml stérile, prélever 1 ml de lait

- Introduit aseptiquement le volume prélevé dans un tube contenant 9 ml de diluant. Ainsi s'obtient une dilution de 1/10.
- Rejeter la pipette dans un récipient contenant de l'eau javellisée.
- Prélever 1 ml de la dilution au 1/10
- L'introduire dans un deuxième tube contenant 9 ml de diluant, ainsi s'obtient une dilution au 1/100.
- Rejeter la pipette.
- Une troisième et quatrième opérations s'effectuent de la même manière afin d'obtenir une dilution, an 1/1000 et 1/10000.

Annexe 09

Teste de catalase : (LAYRAL et JOFFIN, 2001).

Le réactif utilisé dans ce test est le peroxyde d'hydrogène à 10 volumes (H_2O_2). A partir d'un milieu solide et prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée par une exemple sur une lame, l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalytique, ce qui l'on vérifiera facilement par un test sans bactéries.

Si la catalase (+) se traduit par dégagement des bulles d' O_2 , et la catalase (-) s'il n'y a pas dégagement des bulles.

Annexe 10

Examen à l'état frais : (PETRANSCSIENE, 1981). (LAYRAL et JOFFIN, 2001).

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur une lame.
- Prélever à l'aide du fil de platine une fraction de colonie sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci. Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum, on peut aussi déposer une petite goutte d'un milieu liquide.
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enformes des bulles d'air, le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfecte et recommencer).
- Dans certaines conditions, une préparation à l'état frais peut être lutée, c'est en particulier le cas pour les bactéries anaérobies.
- Observer rapidement en faible luminosité et à l'objectif X40, il est possible dans un second temps de passer à l'objectif X 100, veiller à l'observer une grande partie de la lame et à ne pas prolonger l'observation au-de là de 3à10minutes, ne pas hésiter à recommencer.

- Après l'observation : jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant à large spectre (eau de javel par exemple) car les bactéries sont vivants.

- Interprétation : l'examen direct de microorganisme permet d'observer : la morphologie, les dimensions, le mode de groupement, la mobilité, des bactéries sont considérée comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions), et une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux dits mouvements brwniens, qu'il ne fait pas confondre avec la mobilité.