

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-
Alimentaires
I.N.A.T.A-A.

N°d'ordre :

N°de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention de diplôme de Magister en Sciences Alimentaires

Option : Biochimie et Technologies alimentaires

Thème

**Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre utilisée dans la
fabrication du fromage traditionnel Algérien « *Bouhezza* »**

Présenté par : M^{elle} **SENOUSSI Asma**

Devant le jury :

Président :	BARKAT M.	Professeur	I.N.A.T.A-A.-UC1
Rapporteur :	ZIDOUNE. M.N.	Professeur	I.N.A.T.A-A.-UC1
Co- rapporteur:	BENATALLAH L.	M.C/A.	I.N.A.T.A-A.-UC1
Examinatrices :	KHAROUB K.	Professeur	I.N.A.T.A-A.-UC1
	OULAMARA H	M.C/A.	I.N.A.T.A-A.-UC1

Année universitaire : 2010-2013

Résumé

L'objectif de notre travail vise la caractérisation de la microflore et la microstructure de la peau de chèvre lors de sa préparation qui joue un rôle très important durant l'affinage.

Bouhezza est un fromage traditionnel Algérien de terroir. Sa fabrication nécessite l'utilisation spécifique de la peau de chèvre ou de brebis traitée comme une outre « *Chekoua* » pour l'égouttage et l'affinage. L'égouttage est réalisé continuellement à travers les perforations de la *chekoua*. Selon la tradition, la peau de chèvre est traitée avec du sel et du genièvre et doit être mise en contact avec le *lben* pendant une nuit.

Nous avons confectionné quatre sacs (petites *chekoutes*) à partir de deux peaux entières. Deux ont été maintenues fraîches et les deux autres ont été séchées à l'air. Les résultats ont montré que la microflore initiale des *Chekouates* se caractérise par une faible charge bactérienne avec absence de levures, de moisissures et de l'ensemble de la flore pathogène. Le contact avec le *lben* induit une élévation de la charge et l'apparition des levures.

La PCR-*Temporal Temperature Gel Electrophoresis* a montré une diversification de l'écosystème bactérien avec dominance des bactéries lactiques. Un échange de microorganismes a été noté entre la *Chekoua* et le *lben* ajouté durant une nuit.

L'observation microscopique par MEB a révélé que la surface des *chekouates* est ridée se caractérisant par des plis cutanés. Les fibres sont plus épaisses et bien distinctes dans la peau fraîche contrairement à la peau sèche qui a montré des fibres presque fusionnées. Le diamètre des pores varie entre 41 à 140µm dans la *chekoua* humide et entre 34 et 121 µm dans la *chekoua* sèche.

D'autre part les observations microscopiques par MEB et MCBL ont montré l'enrichissement microbien du biofilm de la *chekoua* après contact avec le *lben*. les microorganismes observés sont sous forme de diplocoques, de bacilles et de levures. D'autre part, la MCBL a révélé la présence de bactéries vivantes et mortes dans les quatre sacs.

Mots clés : Peau de chèvre « *Chekoua* », microbiologie, microstructure, PCR-TTGE

Abstract

The objective of our work is the characterization of goat skin microflora and microstructure during its preparation which plays a very important role in ripening.

Bouhezzais is a local Algerian traditional cheese. Its making process requires the exceptional use of treated goat skin or ewe skin called "*Chekoua*" for draining and ripening. The draining happens continuously through "*Chekoua*" perforations. According to tradition, goat skin is treated with salt and juniper and it must be in contact with "*lben*" for a whole night.

We have made four bags (small *chekouates*) from two whole skins. Two were maintained fresh and the other two were air dried. The results showed that the initial *Chekouates* microflora were characterized with low bacterial load with the absence of yeast; molds and the pathogenic flora. However, the contact with "*lben*" provoked an increase of the microbial load and the apparition of yeasts.

The PCR-*Temporal Temperature Gel Electrophoresis* showed a diversification of the bacterial ecosystem with the dominance of lactic bacteria. A microorganisms exchange has been observed between the "*Chekoua*" and the "*lben*".

The Microscopic (MEB) observation has revealed that the surface of *chekouates* is wrinkled characterized with skin folds. The fibers are thicker and distinct in the fresh skin contrary to the dried skin which has showed nearly merged fibers. Pores diameter varies between 41 to 140 μm in the fresh "*chekoua*" and 34 to 121 μm in the dried one.

In the other hand, the microscopic (MEB and MCBL) observations showed the microbial enrichment of "*chekoua*" biofilm after being in contact with "*lben*". The observed microorganisms are in form of diplococcal, bacilli and yeast. The confocal microscopy (MCBL) revealed the presence of living and dead bacteria in the four bags.

Key words: Goat skin « *Chekoua* », microbiology, microstructure, PCR-TTGE.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تمييز جلد الماعز من الناحية الميكروبيولوجية والبنوية اللتان يمكن أنيلعبا دورا فعالا من خلال مرحلة النضج.

بوهزة هو جبن تقليدي محلي يتطلب صنعه استخداما استثنائيا لجلد الماعز أو الغنم المعالج على شكل شكوة للتقطير والنضج.

التقطير يتم بصفة مستمرة من خلال الثقوب المنتشرة على الشكوة وفقا لطريقة التحضير التقليدية، جلد الماعز يعالج بالملح والعرعار مع وضع اللبن في الشكوة ليلة قبل استعمالها.

في هذا العمل قمنا بصنع أربعة أكياس من جلدين كاملين لمعزتين، كيسين احتفظنا بهما طازجين والآخران قمنا بتجفيفهما في الهواء الطلق. النتائج أثبتت أن الميكروفلور الابتدائية للشكوات تتصف بنسبة قليلة من الميكروبات مع غياب الخمائر والفطريات والبكتيريات الممرضة.

وضع اللبن في الشكوات يؤدي إلى ارتفاع في نسبة الميكروبات وظهور الخمائر.

التقنية *PCR- Temporal Temperature Gel Electrophoresis* أثبتت تنوع النظام الإيكولوجي البكتيري مع هيمنة البكتيريا اللبنية حيث اكتشفنا أيضا وجود تبادل ميكروبيولوجي بين اللبن خلال وجوده داخل الشكوات وجلد الماعز.

أثبتت الملاحظة المجهرية بواسطة المجهر الإلكتروني أن جلد الماعز مجعد يحتوي على انثناءات. الألياف أكثر سمكا ومتميزة في الجلد الناضج على عكس الجلد الجاف الذي أظهر أليافا تقريبا مندمجة.

قطر الثقوب يتغير من 41 إلى 140 μm في الشكوة الناضجة ومن 34 إلى 121 μm في الشكوة الجافة.

كشفت الملاحظة المجهرية (MEB و MCBL) أن بيوفيلم جلد الماعز بعد إضافة اللبن غني جدا مقارنة ببيوفيلم الجلد قبل إضافة اللبن.

أيضا لاحظنا أن الجلدين لهما نفس التركيبية النوعية : مكورات مزدوجة، العصيات والخمائر.

الفحص المجهرى نتحد البؤر (MCBL) لجلد الماعز كشف لنا وجود بكتيريا حية وبكتيريا ميتة في جميع العينات المدروسة.

الكلمات الدالة : جلد الماعز "شكوة"، علم الاحياء المجهرية، البنية المجهرية، PCR-TTGE

Remerciements

Je rends grâce à Dieu, le miséricordieux, le tout puissant, pour ce miracle appelé vie, que sa lumière nous guide vers lui, et que son nom soit l'élixir de nos peines et douleurs.

*Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur **ZIDOUNE Mohammed Nasreddine** Professeur à l'université de Constantine et Chef de l'équipe Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) du Laboratoire de Recherche en Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.), pour m'avoir donné la chance de travailler sous sa direction, pour m'avoir dirigée tout au long de la réalisation de ce travail, pour ses encouragements mais surtout pour son générosité dans le travail, qu'il trouve en ces mots toute ma gratitude.*

*Mes remerciements les plus distingués à Madame **AISSAOUI ZITOUN OUARDA** pour son esprit scientifique, ses précieux conseils et ses encouragements. Son intérêt à mon sujet de mémoire, et ses précieuses et clairvoyantes orientations. Mes remerciements sont adressés aux membres du Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :*

*Mme le professeur **BARKAT M.** qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury*

*Mme le professeur **KHAROUB K** qui a eu l'amabilité de participer à ce Jury*

*Mme Dr **OULAMARAH** qui a bien voulu examiner ce travail*

*Mes sincères remerciements vont à Mme **BENATALLAH Leila** et **BOUCHEHAM Nouhed** pour leur aide pour la réalisation de ce travail*

*Je tiens à remercier ma copine et ma sœur **BENMESSAI Wafia** pour sa grande contribution à la réalisation de ce travail*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à madame **Stefania CARPINO** directrice de recherche de m'avoir accueillie au sein de son équipe aux laboratoires « Consorzio per la Ricercasulla Filiera Lattiero-Casearia » (CoRFiLaC) pendant mon séjour en Italie.*

*Je remercie particulièrement **Concetta PEDILIGGIERI**, technicienne au laboratoire « Laboratorio di biologiamolecolare »*

Je n'oublie pas à remercier les personnels de CoRFiLaC pour leur aide scientifique et pour leur encouragement et leur amitié. Je cite en particulier Linda MIGLIORISI, Stefania MIRABILLA, Giovanni MARINO, Giovanni FARINA, Glenda LETO, Mario MANENTI, Lucia CORALLO

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au cours de la réalisation de cette étude : personnel et enseignants de l'INATAA, et à tous les autres.

*Enfin, Merci à **Ma famille**...et surtout à ma mère, elle qui continue de croire en moi malgré toutes les difficultés et tous les obstacles.*

Sommaire

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations

INTRODUCTION

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. la matière première de la fabrication fromagère : le lait.....	03
1.1. Composition biochimique du lait.....	03
1.2. Microbiologie du lait.....	04
2. Principes généraux de la technologie fromagère.....	05
3. Fromage traditionnel Algérien <i>Bouhezza</i>.....	07
3.1. Procédé traditionnel de la fabrication de <i>Bouhezza</i>	07
3.2. Microflore de <i>bouhezza</i>	10
4. Peau de chèvre.....	11
4.1. Définition.....	11
4.2. Structure de la peau.....	11
4.3. Composition chimique de la peau.....	13
4.4. Utilisations de la peau.....	13
4.5. Conservation de la peau.....	14
5. Lben.....	14
5.1. Définition.....	14
5.2. Mode de préparation du Lben.....	14
5.3. Mode de consommation du Lben.....	14
5.4. Composition physicochimique du lben.....	15
5.5. Microbiologie du Lben.....	15
6. Méthodes de caractérisation de l'écosystème microbien.....	15
6.1. Approche classique (culture dépendante)	16
6.2. Approche moléculaire (culture indépendante)	16
6.2.1. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)	17
6.2.2. Méthodes moléculaire culture-indépendante.....	18
7. Méthodes de caractérisation des surfaces.....	19
7.1. Microscope électronique à balayage (MEB)	19
7.2. Microscope confocal à balayage laser (MCBL)	21

MATERIELS ET MÉTHODES

1. Matériels et Matières premières.....	23
1.1. Peau de chèvre et préparation des <i>chekouates</i>	23
1.2. Lait et obtention de <i>lben</i>	25
1.3. Genièvre.....	26
1.4. Sel.....	26
2. Caractérisation physicochimique du lait et du <i>lben</i>.....	27
2.1. Caractérisation physicochimique du lait.....	27
2.2. Caractérisation physicochimique du <i>lben</i>	27
2.2.1. Détermination de pH.....	27
2.2.2. Détermination de l'acidité titrable (°SH)	27
2.2.3. Détermination de l'extrait sec total	28
2.2.4. Dosage de la matière grasse.....	28
2.2.5. Dosage des protéines.....	28
2.3. Suivi de l'évolution de pH et de température du lait au cours de la fermentation.....	30

2.4. Suivi de l'évolution de pH et de l'acidité titrable de lben pendant son séjour dans les <i>chekouates</i>	30
3. Caractérisation microbiologique du lait, lben et Chekouates	30
3.1. Mode de prélèvement des échantillons.....	30
3.1.1. Lait.....	30
3.1.2. <i>Lben</i>	30
3.1.3. Peau de chèvre.....	31
3.2. Dénombrement des principales flores.....	32
3.2.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile.....	32
3.2.2. Dénombrement des lactobacilles.....	32
3.2.3. Dénombrement des lactocoques.....	32
3.2.4. Dénombrement des levures et des moisissures.....	33
3.2.5. Dénombrement des entérobactéries.....	33
3.2.6. Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.3. PCR-TTGE (<i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>).....	34
3.3.1. Principe.....	34
3.3.2. Extraction de l'ADN génomique.....	35
3.3.3. Amplification de l'ADN génomique.....	36
3.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	37
3.3.5. Préparation de gel polyacrylamide et analyse en TTGE(<i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>).....	37
3.4. Recherche des bactéries pathogènes par le système BAX®	40
4. Caractérisation microscopique de la peau de chèvre	41
4.1. Mode de prélèvement des échantillons.....	41
4.2. Analyse par le microscope électronique à balayage (MEB).....	42
4.3. Analyse par le microscope confocal à balayage laser (MCBL).	43
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Caractérisation physicochimique	45
1.1. Composition physicochimique de lait et de <i>lben</i>	45
1.2. Évolution de pH et de la température au cours de la fermentation.....	45
1.3. Évolution de pH et de l'acidité titrable de <i>lben</i> durant son séjour dans les <i>chekouates</i>	46
2. Caractéristiques microbiologiques	47
2.1. Caractéristiques microbiologiques de lait et de <i>lben</i>	47
2.2. Caractéristiques microbiologiques de la peau de chèvre avant contact avec <i>lben</i>	49
2.3. Caractéristiques microbiologiques de la peau de chèvre après contact avec <i>lben</i>	50
2.4. Caractéristiques microbiologiques de <i>lben</i> au cours de son séjour dans les peaux fraîches et sèches.....	50
3. Identification de l'écosystème par PCR-TTGE (<i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>)	51
3.1. Écosystème microbien du lait et de <i>lben</i>	51
3.2. Écosystème microbien des peaux de chèvres avant et après contact avec <i>lben</i>	52
.....	55
3.3. Écosystème microbien de <i>lben</i> au cours de son séjour dans les <i>chekouates</i>	56
3.4. Effet de contact sur l'écosystème de peau de chèvre et de <i>lben</i>	57
4. Détection des bactéries pathogènes	59

5. Caractérisation microscopiques de la peau de chèvre.....	59
5.1. Résultats d'analyse par le microscope électronique à balayage.....	67
5.2. Résultats d'analyse par le microscope confocal à balayage laser.....	71
Conclusion.....	73
Références bibliographiques.....	
<i>Annexes</i>	

Liste des figures

Figure 1. Diagramme de préparation de la <i>Chekouade Bouhezza</i>	9
Figure 2. Diagramme adopté pour la fabrication artisanale du fromage <i>Bouhezza</i> dans la <i>chekoua</i>	10
Figure 3. Coupe transversale d'une peau de chèvre.....	12
Figure 4. Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage.....	20
Figure 5. Schéma de principe de la microscopie confocale.....	22
Figure 6. Schéma représentatif des différentes étapes de préparation de la peau de chèvre.....	24
Figure 7. Schéma représentatif des différentes étapes d'obtention des échantillons.....	25
Figure 8. Diagramme de fabrication artisanal du <i>lben</i>	26
Figure 9. A, B, C zones de prélèvement de biofilm (vue dorsale) de la peau de chèvre....	31
Figure 10. Schéma d'une colonne de fixation de l'ADN (colonne DNeasy)	35
Figure 11. Images représentatives de mode de prélèvement des échantillons de peau pour l'observation microscopiques.....	42
Figure 12. Courbes représentatives de l'évolution de la température et de pH en fonction de la durée de fermentation.....	46
Figure 13. Évolution de pH et de l'acidité titrable de <i>lben</i> durant son séjour dans les <i>chekouates</i>	46
Figure14. Évolution de la flore totale aérobie mésophile (FTAM), Lactobacilles, lactocoques, levures, moisissures dans les échantillons de <i>lben</i> au cours de son séjour dans les peaux fraîches et sèches.....	51
Figure15. Identification par PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites de lait et de <i>lben</i> préparé.....	52
Figure 16. Identification par PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites de biofilm des quatre <i>chekouates</i> analysées avant et après contact avec <i>lben</i>	53
Figure 17 . Identification par la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites des échantillons de <i>lben</i> prélevé après 30,60, 120 min et 16h de contact avec les quatre <i>chekouates</i>	55
Figure18. Photos montrant la microstructure de la peau fraîche A) PF1 ; B) PF2.....	62
Figure19. Photos montrant la microstructure de la peau sèche A) PS1 ; B) PS2.....	63
Figure 20. Photos montrant la structure fibreuse de peau fraîche et sèche. A) Peau fraîche ; B) Peau sèche.....	63
Figure 21. Photos montrant la structure fibreuse (invisible) de peau fraîche (A) et sèche (B) recouverte partiellement ou presque entièrement avec les granules de caséines.....	63
Figure 22. Biofilm des deux peaux sèche A) PS1 et B) PS2.....	64
Figure 23. Biofilm des deux peaux fraîche A) PF1 et B) PF2.....	65
Figure 24. Biofilm des deux peaux fraîche après contact avec <i>lben</i> A) PF1Lb et B) PF2Lb.....	65
Figure 25. Biofilm des peaux sèche après contact avec <i>lben</i> A) PS1Lb ;B)PS2Lb.....	65
Figure 26. Biofilm de peau fraîche après contact avec <i>lben</i> (PF2Lb)	66
Figure 27. Biofilm de la peau fraîche après contact avec <i>lben</i> (PF1Lb)	66
Figure 28. Biofilm de peau sèche après contact avec <i>lben</i> PS1Lb.....	66
Figure 29 . Biofilm de peau sèche après contact avec <i>lben</i> PS2Lb.....	67
Figure 30. Photos (image) montre PF1 (la peau codée en bleu) presque vide, juste quelques cellules isolées.....	68
Figure 31. Photo montre PF2 (la peau codée en bleu) presque vide, juste quelques cellules détectées (codées en vert et en rouge)	68

Figure 32. Photo montre PS1 (la peau codée en bleu) légèrement colonisé en microorganismes, les microorganismes vivants sont codés en vert et les cellules mortes sont codées en rouge.....	68
Figure 33. Photo montre les pores de PS1. Les pores de cette peau sont plus grands que les pores des peaux fraîches.....	69
Figure 34. Photo montre PS2 A) Zone vide, B) Zone colonisée.....	69
Figure 35. Photo montre PF1Lb, l'échantillon est colonisé de nombreux microorganismes.....	69
Figure 36. Photos montre PF2Lb colonisées par des bactéries organisées en chaînes et quelques levures isolées et mortes ont été détectées.....	69
Figure 37. PF2Lb. Moisissures occasionnellement retrouvé.....	70
Figure 38. PS1Lb, densité bactérienne élevée quelques bactéries mortes et vivantes et les levures isolées mortes.....	70
Figure 39. PS2Lb, bactéries (vivantes et mortes) et les levures isolées mortes.....	70

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique moyenne du lait de vache.....	3
Tableau 2. Composition générale de la peau de chèvre brute.....	13
Tableau 3. Volumes des échantillons de <i>Lben</i> prélevés.....	31
Tableau 4. Composition du milieu réactionnel pour PCR (MixPCR)	36
Tableau 5. Composition des gels de séparation et de concentration.....	37
Tableau 6. Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE.....	38
Tableau 7. Les espèces de la base de données, selon PARAYRE <i>et al.</i> (2007).....	39
Tableau 8. Composition physicochimique de lait et de <i>Lben</i>	45
Tableau 9. Caractéristiques microbiologiques de lait et de <i>lben</i> (UFC/ml)	47
Tableau 10. Caractéristiques microbiologiques des peaux fraîches et sèches analysées avant contact avec <i>lben</i> (UFC/300cm ²)	49
Tableau 11. Caractéristiques microbiologiques de la peau de chèvre après une nuit de contact avec <i>lben</i> (UFC/300cm ²)	50
Tableau 12. Présence ou absence des trois bactéries pathogènes dans le lait, <i>lben</i> et biofilm de peau de chèvre.....	57
Tableau 13. Résultats d'analyse quantitative (porosité) des deux peaux de chèvre.....	59

Liste des abréviations

ADN Acide **Dé**soxyribonucléique
ARN Acide **Ri**bonucléique
°C degré celsius
°D degré Dornic
dNTP desoxyribonucléotidetriphosphate
DO **Densité Optique**
CMP Caséin**o**macropeptide
D_{max} Diamètre maximal
D_{min} Diamètre minimal
DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EDTA acide **Ethyl Diamine Tetra Acétique**
G C Guanine Cytosine
g gramme
h heure
HCL acide chlorhydrique
J jour
L litre
M Molaire
MEB Microscope Electronique à **Balayage**
MgCL₂ Chlorure de magnésium
MGES Pourcentage de la matière grasse dans l'Extrait sec (Teneur en matière grasse du fromage X 100)/ poids total du fromage –poids de l'eau dans le fromage.
Min Minute
mM milliMolaire
N Normalité
NaCL
nm nanomètre
pb paire de base
PCR *Polymerase Chain Reaction*
rpm **R**otation **P**ar **M**inute
SEM Scanning Electron **M**icroscopy
Subsp sous espèce
TA Tris Acétate **EDTA**
TE Tris **EDTA**
TEMED Tétraméthyléthylènediamine
TEFD Pourcentage de la **T**eneur en **E**au dans le **F**romage **D**égraissé, (poids de l'eau dans le fromage) ×100/poids total du fromage-poids de la matière grasse dans le fromage.
T_m Température de fusion (*MeltingTemperature*).
TTGE Temporal Temperature **G**el **E**lectrophoresis
U Unité
UFC Unité formant **C**olonie
V Volt
µl microlitre

Introduction

INTRODUCTION

Les produits traditionnels font partie du patrimoine national de chaque pays. Parmi ces aliments il y a les fromages traditionnels pour lesquels chaque variété apparaît comme le reflet fidèle de la région dont ils sont originaires, avec leurs ressources naturelles et leurs traditions. La grande tradition de la qualité fermière tend malheureusement à disparaître peu à peu. Le monde rural connaît une mutation profonde négligeant ainsi le devenir de ces produits.

En Algérie, les fromages traditionnels sont nombreux, non entièrement recensés et aussi peu étudiés. Environ dix types de fromages sont connus dans les différentes régions du pays (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a). La plupart de ces fromages, tel que *Bouhezza*, *Medghissa* et *Mechouna*, dans la région des *Chaouia*, *Takemmèrite* et *Aoules* dans le Sud, *Igounanes* dans la région de la Kabylie, sont en voie de disparition pour différentes raisons dont l'indisponibilité fourragère, l'exode rurale et le changement des habitudes alimentaires. Ainsi le nombre restreint de personnes intéressées par la fabrication traditionnelle ainsi que la perte du savoir faire traditionnel entraîne une irrégularité du goût et pose par la suite des difficultés dans la satisfaction des besoins des consommateurs. Pour cela, il conviendrait d'encourager leur fabrication en vue de les faire connaître et maintenir leur existence.

Bouhezza est un fromage de terroir, connu depuis longtemps dans la région *Chaouia* de l'est du pays regroupant principalement les wilayas d'Oum El Bouaghi, Batna, Khenchla et Tebessa. C'est le produit de transformation du lait de chèvre et de brebis. Toutefois, la tendance actuelle semble s'orienter vers l'utilisation du lait de vache.

Ce fromage a déjà fait l'objet de d'études scientifiques au sein de l'équipe de recherche T.E.P.A (Transformation et Élaboration des produits Agro-alimentaires) du Laboratoire de Nutrition et Technologie Alimentaire (L.N.T.A.) (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006 ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011b ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2012 ; SAOUDI, 2012), par ailleurs, il reste beaucoup à faire, notamment au niveau du procédé de fabrication qui nécessite l'usage traditionnel de la peau de chèvre traitée en tant qu'outre « *chekoua* » de salage, d'égouttage et d'affinage. Au stade de consommation, le fromage est mélangé avec du piment rouge, ce qui lui donne son goût particulier.

La peau de chèvre implique naturellement une grande diversité microbienne de sa flore microbienne. Cette flore, qualifiée de naturelle ou indigène reste encore inconnue. Elle peut jouer un rôle très important durant la production du *Bouhezza*. Dans ce contexte, notre travail a pour but la caractérisation de la peau de chèvre traitée selon le diagramme

traditionnel de fabrication du fromage *Bouhezza*. Ceci a été abordé à travers les objectifs suivants :

1- Etude de l'écosystème microbien à l'aide d'une technique basée sur la biologie moléculaire (PCR-TTGE *Polymerase Chain- Reaction Temporal Temperature Gel Electrophoresis*). L'énumération des principaux groupes microbiens a été réalisée par dénombrement sur milieux sélectifs. La recherche de quelques pathogènes a été réalisée en vue d'avoir une idée sur la qualité hygiénique de la *Chekoua* et éventuellement celle du fromage *Bouhezza*

2- Etude de la microstructure de la peau par Microscopie Electronique à balayage (MEB) et par Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL).

Notre manuscrit comporte en premier lieu une étude bibliographique présentant la composition biochimique et microbiologique du lait et du *Iben*, les principes de la technologie fromagère, des généralités sur le fromage *Bouhezza* et la peau de chèvre ainsi qu' un aperçu sur les différentes techniques de caractérisation microbiologique et microstructurale de la peau de chèvre. En deuxième volet, nous décrivons la méthodologie adoptée et à la fin ,nous donnons nos résultats obtenus et leur discussion suivis d'une conclusion qui permet d'ouvrir sur les perspectives de ce travail.

Synthèse
Bibliographique

1. Matière première de la fabrication fromagère : le lait

La dénomination lait sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. C'est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum (JORA, août, 1993).

1.1. Composition biochimique du lait

Du point de vue physicochimique, le lait est un produit très complexe. Une connaissance approfondie de sa composition, de sa structure et de ses propriétés physiques et chimiques est indispensable à la compréhension de ses différentes transformations (AMIOT *et al.*, 2002). Il faut noter l'importance de l'eau et la valeur modeste de la matière sèche totale. Plus cette dernière sera élevée, plus le lait sera riche et meilleur sera le rendement fromager.

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lait de vache (GOURSAUD, 1985)

Composants	g/l	Extrêmes
Eau	902	
Glucides lactose	49	40-60
Matières grasses	39	25-45
-Lipides	38	
-Phospholipides	0,5	
-Composés liposolubles	0,5	
Matières azotées	33	25-40
-Caséines	28	
-Protéines solubles	4,7	
-Azote non protéique	0,3	
Matières salines	9	7-10
Biocatalyseurs (vitamines, enzymes)	Traces	
Gaz dissous	≤ 5% du volume	
Matières sèches totale	130	
Poids total	1032	

Selon ALAIS (1984) le lait est donc un milieu hétérogène dans lequel trois phases distinctes coexistent :

- 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 la 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.

1.2. Microbiologie du lait

Presque tous les germes peuvent proliférer très facilement dans le lait qui constitue un excellent milieu de culture (VEISSEYRE, 1979). Les micro-organismes du lait cru sont souvent abordés sous l'angle technologique. En effet, ils jouent un rôle non négligeable en transformation fromagère du lait cru et sont communément classés en microflore d'intérêt technologique, microflore d'altération, et microflore potentiellement pathogène (RICHARD, 1983).

1.2.1. Flore utile ou flore d'intérêt technologique

La flore utile ou la flore d'intérêt technologique jouent un rôle dans l'acidification des fromages (bactéries lactiques comprenant les lactocoques, leuconostocs, entérocoques et lactobacilles) et dans l'affinage des fromages par leur aptitudes protéolytiques et lipolytiques (entérocoques, lactobacilles, flores halophiles : microcoques et bactéries coryneformes, levures et moisissures) (MICHEL *et al.*, 2001).

1.2.2. Flore d'altération

Les principales bactéries identifiées comme flore d'altération sont *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, coliformes, soit principalement les genres d'*Escherichia* et d'*Entérobacter*, les sporulés telle que *Bacillus* sp, *Clostridium* sp et certains levures et moisissures. Elle causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira la durée de conservation du produit (LAMONTAGNE *et al.*, 2002)

1.2.3. Flore pathogène

La présence des micro-organismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'Homme, l'environnement. Les principaux micro-organismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (GUIRAUD, 2003).

La gestion de ces communautés microbiennes, pour favoriser les flores utiles et inhiber les flores pathogènes, est donc un des facteurs clef de la maîtrise de la qualité des fromages (IRLINGER, 2000).

2. Principes généraux de la technologie fromagère

Le fromage a une longue tradition dans l'alimentation humaine. Autrefois, il s'agissait principalement d'une forme concentrée de lait qui avait l'avantage d'avoir une durée de conservation prolongée (WALTHER *et al.*, 2008), obtenues grâce au jeu croisé de l'élimination plus ou moins poussé de l'eau du lait et de la récupération des matières sèches. Selon BRULE *et al.* (1997), la transformation du lait en fromage comporte quatre étapes principales : la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage.

2.1. Coagulation

Selon RAMET (1985), la coagulation correspond à une déstabilisation de l'état micellaire originel de la caséine du lait. Cette déstabilisation est réalisée de deux manières :

- par voie enzymatique à l'aide d'enzymes coagulantes, en particulier la présure.
- par voie fermentaire à l'aide de bactéries productrices d'acides lactiques se trouvant naturellement dans le lait et/ou apportées sous forme de ferments.

2.1.1. Coagulation par acidification

L'acidification du lait peut être obtenue, par les produits de fermentations des bactéries acidifiantes ou par les composés chimique d'action acidifiante directe (généralement par acide lactique ou acide chlorhydrique) ou action indirecte (généralement l'hydrolyse de glucose δ -lactone) (FOX *et al.*, 2000).

L'apport de protons H^+ par fermentation lactique, entraîne une diminution de nombre des charges négatives des micelles et donc une diminution de la couche d'hydratation et des répulsions électrostatiques. Simultanément, on a solubilisation progressive de calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse avec désintégration en sous unités micellaires (MAHAUT *et al.*, 2000). Le coagulum ainsi obtenu est le résultat de la formation d'un réseau protéique insoluble englobant dans ses mailles la totalité de la phase aqueuse. Les nœuds du réseau sont les sous unités micellaire totalement déminéralisées et plus ou moins modifiées dans leur structure. Les liaisons intermoléculaires intervenant dans la formation du réseau sont de nature électrostatique et hydrophobe; ceci explique la très grande fragilité du coagulum lactique (BRULE *et al.*, 1997).

2.1.2. Coagulation enzymatique

Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétale ou microbienne, ont la propriété de coaguler le complexe caséinique (BRULE *et al.*, 1997). La présure

(mélange de chymosine et de pepsine) est un extrait liquide ou pâteux provenant de la macération des caillottes des jeunes ruminants dans une saumure à 10% de NaCl. La chymosine est la principale enzyme de coagulation du lait présente dans la présure. C'est une protéase acide sous forme de proenzyme inactive appelée prochymosine. L'activation de proenzyme en chymosine se fait spontanément dans la caillotte aux pH inférieur à 5 par hydrolyse de l'extrémité N-terminal de la molécule (MAHAUT *et al.*, 2000).

Le mécanisme d'action de la présure est assez bien établi et comporte deux phases :

La phase primaire, ou enzymatique correspond à l'hydrolyse de caséine K au niveau de la liaison PHE₁₀₅-MET₁₀₆. La chaîne peptidique se trouve ainsi coupée en deux segments inégaux : le segment 1-105 est la paracaseïne -K et le segment 106-169, la caseinomacropéptide (CMP). La paracaseïne K liée aux caséines κ et β reste intégrée à la micelle hydrophobe et le CMP contenant tous les glucides est libéré et passe dans le lactosérum (GELAIS *et al.*, 2002). L'autre non enzymatique, c'est la phase de floculation qui dépend strictement de Ca²⁺ et du phosphate de calcium colloïdale (FOX, 1982). Durant la phase secondaire, les micelles de caséine se regroupent en présence de Ca²⁺ (BRULE *et al.*, 1997).

2.2. Egouttage

Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande du lactosérum emprisonné dans les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique (JEANTET *et al.*, 2008). Lors de cette étape, la plus grande partie des éléments solubles sont éliminés dans le lactosérum, on peut considéré qu'il s'agit d'une déshydratation partielle du caillé (GELAIS *et al.*, 2002). Ce processus est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécaniques et thermiques, des facteurs indirectes (acidification et/ou coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséines, en protéines solubles et en matière grasse) (VEISSEYRE, 1979 ; RAMET, 1987)

2.3. Salage

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau. Selon les paramètres mis en œuvre au niveau des différentes étapes de transformation du lait en fromage, une grande variété de produits peut être obtenue tel que traduit par Fox et coll (FOX et MCSWEENEY, 2004)

La teneur moyenne de sel de la plupart des fromages est de 0,5-2g/100g de fromage, dans certains cas (les fromages bleus et quelques fromages de chèvres), elle peut s'élever à 3-4% (ALAIS et LINDEN, 1997)

2.4. Affinage

L'affinage correspond à une digestion enzymatique des constituant du caillé égoutté (GELAIS *et al.*, 2002)

3. Fromage traditionnel algérien *Bouhezza*

Bouhezza est un fromage Algérien de terroir, sa fabrication est spécifiquement pratiquée chez les populations *chaouia* implantées dans la région est de l'Algérie. *Chaouia* est la dénomination donnée aux habitants berbères de l'Aurès (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). La pratique du fromage *Bouhezza* s'étale de la région de l'Aurès à Batna jusqu'aux frontières tunisiennes à Tébessa (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUN, 2006).

Selon ZAIDI *et al.* (2000), *bouhezza* est un fromage fermier à égouttage spontané et à pâte épiciée, non moulée, préparée à l'origine à partir de lait de chèvre et éventuellement de brebis mais actuellement avec le lait de vache.

3.1. Procédé traditionnel de fabrication du fromage *Bouhezza*

La fabrication du fromage traditionnel passe d'abord par la préparation et la confection d'un contenant de la pâte fromagère « *Chekoua* » ensuite par la production proprement dite du fromage (ZAIDI, 2002 ; AISSAOUI ZITOUN, 2004).

3.1.1. Préparation de la *chekoua* de *Bouhezza*

Selon LEMOUCHI. (2007), la préparation de *Chekoua* consiste à utiliser la peau de différentes races (brebis ou chèvre). La peau de chèvre ou de chevreau semble égoutter mieux, elle est plus épaisse, solide et plus résistante aux chocs (RACHEF, 2006 ; BEDDIAR et BENHANAYA, 2006 ; BENMESSAI et FETHALLAH, 2009).

La *Chekoua* de *Bouhezza* se présente comme un sac souple et humide, ayant la couleur de la peau et se caractérise par une certaine perméabilité. En effet, elle joue à la fois un rôle d'un contenant de la masse fromagère et d'un séparateur de phase, c'est à travers les perforations naturelles de la peau que le lactosérum est exsudé (AISSAOUI ZIDOUN et ZIDOUN, 2006).

Avant utilisation, la peau de chèvre nécessite un traitement approprié (figure 1). Elle est laissée se putréfier à température ambiante environ 2 à 7 jours pour faciliter l'arrachage des poils ou de la laine. Après lavage avec l'eau, la peau est traitée principalement avec le sel et le genièvre avec possibilité d'incorporer aussi d'autres produits (tanins, romarin, semoule, orge).

Selon AISSAOUI ZITOUNE. (2004), La confection d'un sac servant de *Chekoua* est réalisée en refermant les ouvertures correspondantes aux membres antérieurs et toutes les parties postérieures ayant servies à la dépouille de la carcasse. La peau est d'abord ajustée au

niveau de sa grande ouverture postérieure en la découpant transversalement à la limite des pattes postérieures la couture à ce niveau autour d'un support (os) permet de fermer le fond de la *Chekoua* et de fixer le cordage nécessaire à sa suspension une fois prête à l'emploi. Les deux petites ouvertures des pattes antérieures subissent séparément une nouaison double serrant la peau à l'aide d'une corde fine autour d'un morceau d'écorce (de tanin) taillé aux dimensions et formes d'une noix de manière à permettre leur fermeture et la suspension de la *Chekoua* à l'aide du même cordage. Les deux nœuds obtenus se trouvent indépendants mais reliés entre eux par la même corde qui les a assurés. A la fin de cette double nouaison la face externe de la peau se trouve retournée vers l'intérieur. Le reste des débris de genièvre et des odeurs putrides sont éliminés à l'aide de lben (1 à 2 l) qui doit être mis en contact avec les différentes parties de la *Chekoua* pendant quelques heures à une nuit. Après vidange, la *Chekoua* est rincée avec l'eau salé ou non, puis gonflée et suspendue. La *Chekoua* est ainsi prête à l'utilisation immédiate. La figure 1 présente le diagramme des différentes étapes de la préparation de la *chekoua* de *Bouhezza* issu de l'exploitation des résultats de l'enquête réalisée par AISSAOUI ZITOUN. (2004).

3.1.2. Lben de fabrication

Le processus de fabrication du fromage *Bouhezza* débute habituellement en mois de mars/avril, partant d'une quantité initiale de *Lben*, complétée durant toute la période de fabrication par des ajouts de lben ou de lait cru (AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE, 2006). Le *Lben* de fabrication est de préférence écrémé et peu acide. L'ajustement des différents ajouts se réalise en fonction de la vitesse d'égouttage et la disponibilité de la matière première (AISSAOUI ZITOUN, 2004 ; BEDDIAR et BENHANAYA, 2006 ; BENMESSAI et FETHALLAH, 2009).

3.1.3. Fabrication de *Bouhezza*

La fabrication du *bouhezza* est une fonction périodique liée à l'abondance laitière au printemps et à la taille de *Chekoua* (RACHEF, 2006). Elle s'étale de plusieurs semaines à quelques mois. Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément durant la période de fabrication (ZAIDI *et al.*, 2000 ; AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a), la consommation est possible à partir d'un mois de fabrication.

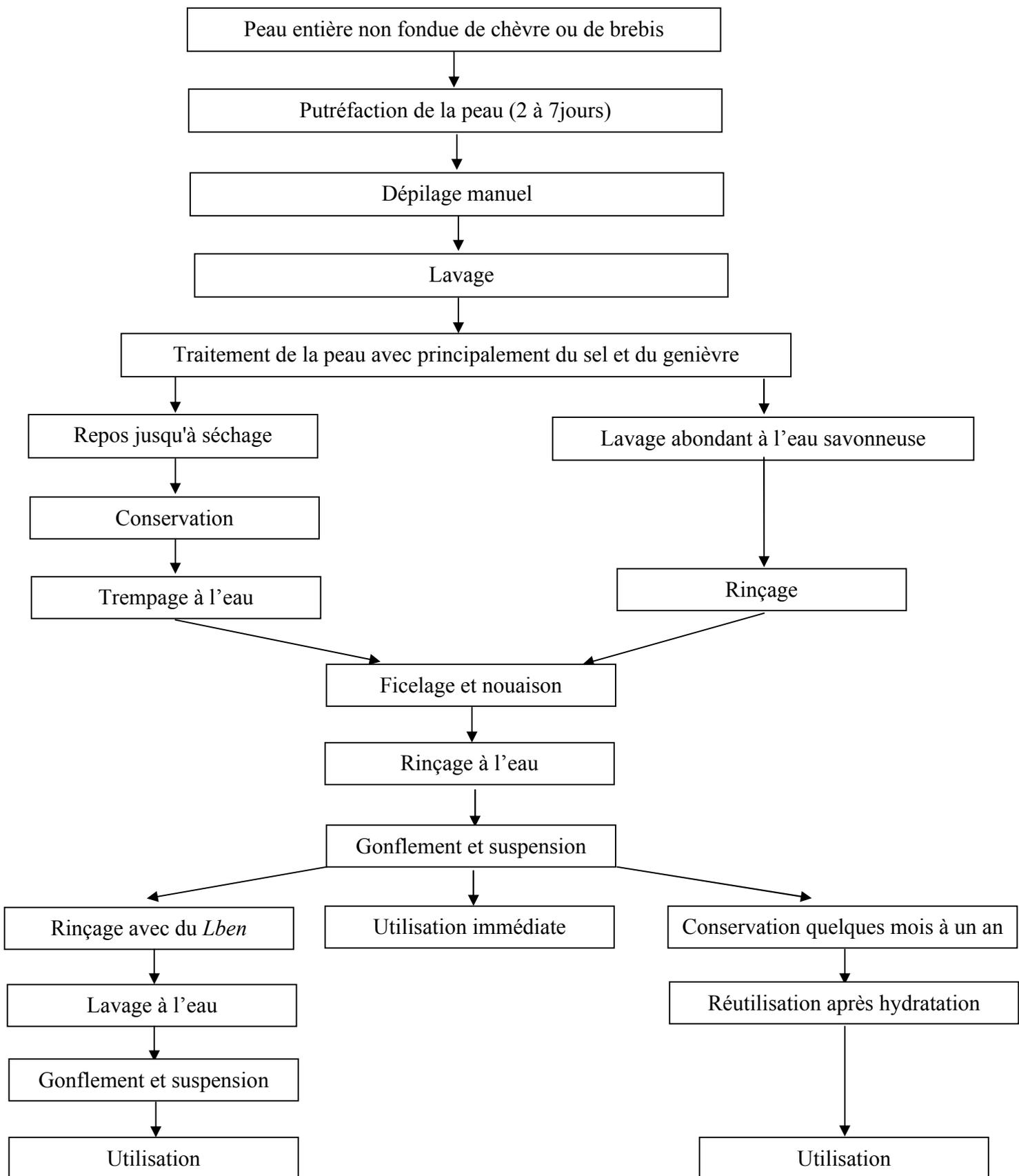


Figure 1. Diagramme de préparation de la *Chekoua* de *Bouhezza*(AISSAOUI ZITOUN, 2004)

La poudre de piment rouge piquant est mélangée avec la quantité du lait cru lors du dernier ajout couplé avec une bonne homogénéisation du fromage dans la *Chekoua*. L'addition de *h'rissa*, poivron noir, vinaigre est possible selon LEMOUCHI.(2007).

Le fromage est conservé dans la *Chekoua*, il peut être aussi conservé dans des récipients soit en verre ou en plastique (AISSAOUI ZITOUN, 2004). Et peut être consommé sous forme de pâte plus ou moins ferme, de tartine sur pain ou déshydraté après séchage et broyage manuel pour assaisonnement de plats traditionnels (*Aiche, Couscous...*) (ZAIDI, 2002). La figure 02 présente les différentes étapes de la fabrication artisanale du fromage *Bouhezza*

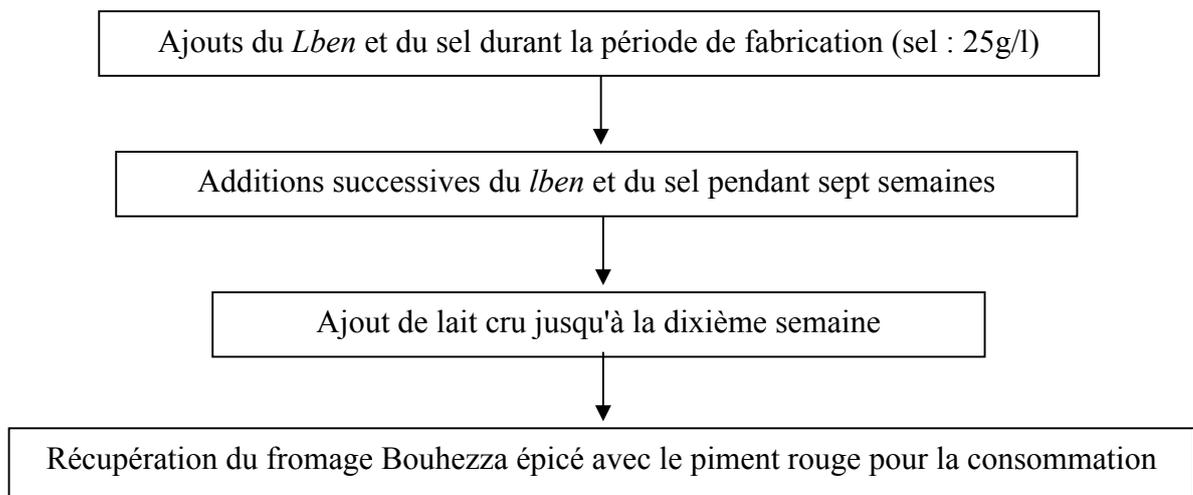


Figure 2. Diagramme adopté pour la fabrication artisanale du fromage *Bouhezza* dans la *chekoua*(AISSAOUI ZITOUN et al., 2011a)

3.2. Microflore de *Bouhezza*

Les bactéries lactiques constituent la majeure partie de la microflore de *Bouhezza*, Selon AISSAOUI ZITOUN et al. (2011a), les lactobacilles représentent des valeurs comprises entre 10^7 à 10^8 UFC.g⁻¹ depuis la troisième semaine de fabrication. Le nombre de lactocoques varie entre 10^5 et 10^6 UFC.g⁻¹ tout au long des sept premières semaines de fabrication. Les ajouts successifs du *lben* au cours de la fabrication enrichissent la masse fromagère en bactéries lactiques. D'autres groupes microbiens sont présents. Comme les moisissures, les entérobactéries, la flore protéolytique et lipolytique.

4. Peau de chèvre

4.1. Définition

La peau de chèvre est un organe frontière, soumis à la fois aux agressions du milieu extérieur et aux perturbations métaboliques de l'organisme. Elle fonctionne comme une barrière de protection physique, chimique et microbiologique face aux agressions de l'environnement. Elle a aussi un rôle dans la thermorégulation, un rôle sensorielle grâce aux récepteurs tactiles, un rôle immunitaire, un rôle de stockage, un rôle métabolique (synthèse de la vitamine D) et un rôle de communication par la sécrétion de substances chimiques (DAVID *et al.*, 2002).

4.2. Structure de la peau

L'épaisseur moyenne de la peau de chèvre est de 2,9mm. Elle décroît de la partie dorsale vers la partie ventrale du tronc

La peau de chèvre par certains aspects, a une structure semblable à celle de la peau de veau et par d'autre à celle de la peau de mouton, mais la totalité de sa structure a des caractéristiques particulières. Les fibres y sont plus serrés que celles du mouton et la fleur est résistante (JULLIEN et GAVEND, 2002 cité par LIONEL, 2005)

Dans la peau de chèvre brute, au moins cinq couches distinctes peuvent être différenciés (figure 3)

- la couche extérieure ou épiderme qui est en contact avec l'extérieur et qui subit les agressions ;
- la surface dermique ou couche de grain ; qui est la couche de cellules vivantes organisées en un tissu très serré. C'est le lieu de naissance des poils et ou sont présentes les terminaisons nerveuses ;
- la jonction entre la surface dermique et l'endoderme ;
- l'endoderme ou Corium la majeure partie du derme ;
- La couche de chair ou hypoderme est une couche majoritairement constituée de cellules graisseuses ; c'est un tissu lâche qui présente une structure adjacente aux tissus du corps.

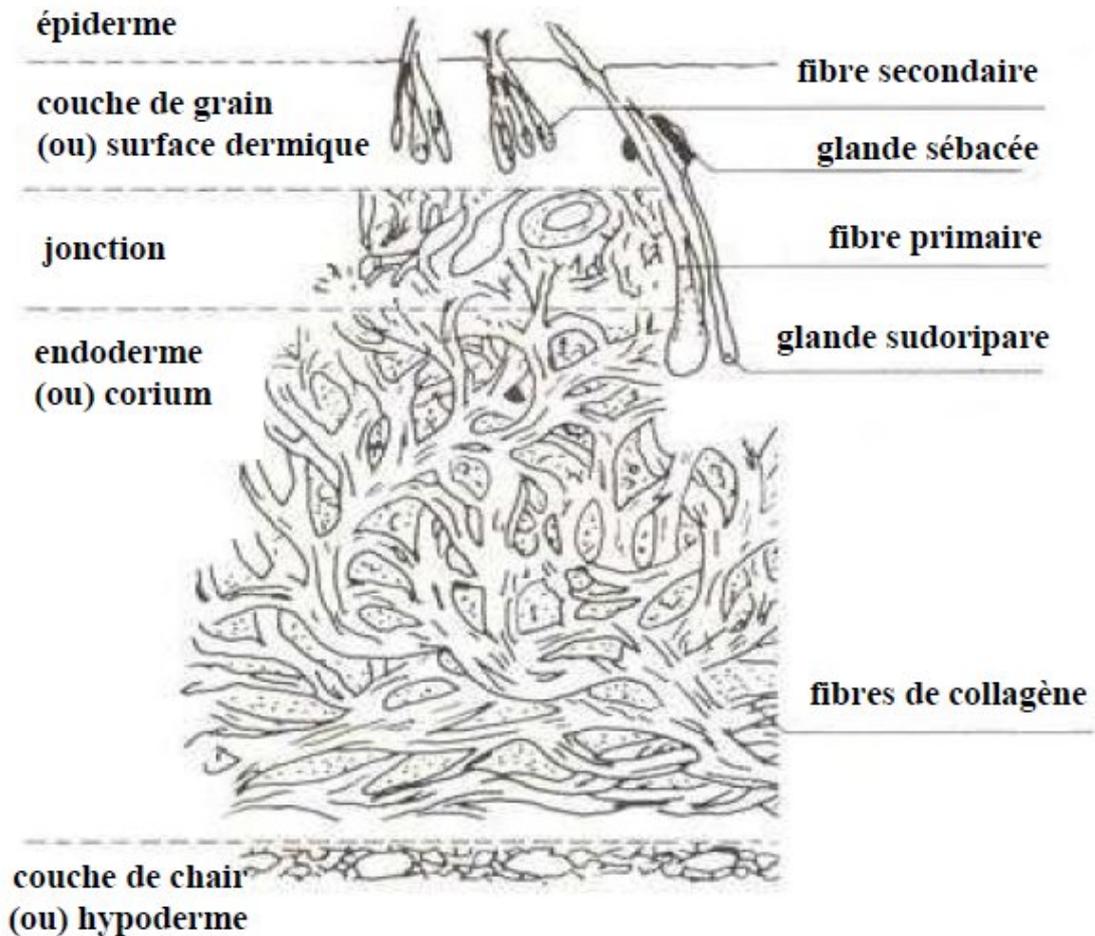


Figure 3. Coupe transversale d'une peau de chèvre (D'après HOLST, 2003 cité par SERHAN, 2008)

Le tissu dermique ou endoderme désigne la quantité de derme servant à faire le cuir et sa composition véritable. Ce derme englobe les facteurs comme la densité de chaque faisceau de fibres ainsi que l'angle de tissage de ces faisceaux et leur entrelacement. Certains cuirs peuvent être bien en chair, élastiques et résistants en raison de la structure de l'entrelacement de la résistance et de la taille des faisceaux de fibres et de l'absence de grands espaces interfibrillaires. D'autres possèdent un tissu plus ouvert, des angles différents d'entrelacement de fibres et une plus grande pénétration du derme par les follicules pileux, les glandes sébacées, etc., qui rendent plus lâche la texture et le toucher du cuir. De toute évidence, ces facteurs jouent un rôle important pour la détermination des caractéristiques physiques du produit. Des faisceaux de fibres mobiles et fortes sont exigés pour des peaux très élastiques et la présence de grands espaces interfibrillaires est souhaitée pour des peaux sans élasticité et sans résistance.

Les poils sont simplement la prolongation, à la surface de la peau, des structures qui sortent des follicules pileux qui pénètrent la surface du grain et se ramifient dans le derme. La

plupart des chèvres élaborent des fibres à partir de deux types de follicules. Les follicules larges (Primaires) produisent des fibres médulleuses, épaisses, alors que les follicules secondaires plus nombreux produisent des fibres fines non médulleuses. Ce sont la taille et le modèle des trous des fibres qui conditionnent la surface du grain ; plus la fibre est épaisse, plus les trous sont grands (HOLST, 2003 cité par SERHAN, 2008).

4.3. Composition chimique de la peau

La peau de chèvre contient, après avoir été retirée de la carcasse, un pourcentage élevé d'eau dans les tissus (60-70%) et une quantité appréciable à la surface, et des protéines (25-33%). Comme la matière sèche de la structure cellulaire contient une grande quantité de protéines, les peaux fournissent naturellement un milieu idéal pour la prolifération des bactéries et des microorganismes (KANAGARAJ *et al.*, 2005a)

La composition générale d'une peau de chèvre brute est présentée dans le tableau suivant

Tableau 2.Composition générale de la peau de chèvre brute (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2009)

Paramètres chimiques	%
H ₂ O	64
Protéines	33
Matière grasse	2
Sels minéraux	0,5
Autres substances (pigments)	0,5

4.4. Utilisations de la peau

En Algérie, la peau de chèvre est confectionnée sous forme de différents contenants: la « Gerba » pour la conservation et le transport de l'eau ; le « *Mezoued* » pour le stockage de certaines denrées alimentaires (épices, semoules, farines et viande séchée, la « *Chekoua* » pour le barattage du lait et pour la fabrication du fromage selon que la peau est imperméabilisée ou non (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

Dans les montagnes du nord de Liban, le fromage artisanal *Darfiyeh* d'où son nom dérive de « *Dariff* », qui est la peau de chèvre employée comme enceinte d'affinage. Il est fabriqué à partir de lait de chèvre (SERHAN *et al.*, 2009).

En Turquie, il existe plusieurs variétés de fromages affinés en poche en peaux de chèvre. Plus de dix sortes de *Tulum* sont produites à partir de lait de chèvre, de brebis ou de vache (HAYALOGLU *et al.*, 2007b).

Aussi, la peau est utilisée dans la confection de chaussures, sacs et autres (FIGUEIREDO *et al.*, 1982). En effet, selon l'objectif d'utilisation de la peau, les modes de traitement se distinguent. La peau peut être humide, colorée, imperméable ou non.

4.5. Conservation de la peau

Il existe plusieurs techniques de conservation chimique, comme le traitement de la peau avec des solutions saturée d'acide borique (KANAGARAJ *et al.*, 2005b), avec 40 à 50% de chlorure de sodium (SUGUNA *et al.*, 2009). Une autre méthode de préservation des peaux de chèvre se fonde sur l'utilisation de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) comme agent antimicrobien (GANESH-BABU *et al.*, 2009). BAILY (2003) a étudié les modes de conservation physiques tels l'irradiation par les rayons gamma.

5. *Lben*

5.1. Définition

Parmi les différents types de laits fermentés qui existent, il y a ceux qui se présentent comme des boissons acidifiées. C'est le cas du « *lben* », fabriqué dans le bassin méditerranéen à partir du lait caillé spontanément puis baratté en présence d'eau. Le beurre est séparé et le liquide résiduel dilué forme le « *lben* » (VEISSEYRE, 1979). La comparaison du processus de fabrication des différents laits fermentés *rob* du soudan (ABEDELGADIR *et al.*, 1998), *lben* marocain (BENKERROUM et TAMIME, 2004) et *leben* tunisien (BEN AMOR *et al.*, 1998), montre qu'ils sont tous similaires au *Lben* traditionnel Algérien.

5.2. Mode de préparation du *lben*

La fermentation du lait donne le « *lben* ». Sa préparation, est très simple, est demeurée au stade familial ou artisanal (BENKERROUM et TAMIME, 2004) : Le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48h suivant la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 min. A la fin de barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10% du volume du lait), chaude ou froide suivant la température ambiante de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre ; produit de grande valeur marchande (TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983).

5.3. Mode de consommation du *lben*

Le *lben* est un produit laitier acide qui fait partie des habitudes alimentaires bien ancrées dans le pays (HARRATI, 1974 cité par KECHA, 1987). Il est considéré comme une boisson traditionnelle très rafraichissante, surtout au mois de carême ou en été. Il est consommé avec la *galette* ou le pain. Il peut accompagner le *couscous*, le *mesfouf*, et d'autres plats (AISSAOUI ZITOUN, 2004).

5.4. Composition physicochimique du *lben*

La composition chimique du « *lben* » est variable, elle dépend des localités, des régions, des fermes, de la composition chimique du lait de départ de la procédure de fabrication (ELBARADEI *et al.*, 2008). Selon KECHA (1987), la caractérisation physicochimique du *lben* artisanal algérien effectuée par HARRATI (1974), révèle que le pH moyen est de 4,2 et que l'acidité est de 73,5°D, la teneur en matière sèche totale de 68 g/l.

Le métabolisme microbien et particulièrement la fermentation du citrate dans le lait génère des composés carbonés volatils (acétaldéhyde, acétoïne, et le diacétyl). Aussi la présence d'éthanol dans « *lben* », c'est un élément qui confère un arôme typique au produit, pourtant, sa concentration est trop faible pour donner un goût alcoolique au produit (BENKERROUM et TAMIME, 2004 ; OUADGHIRI, 2009).

5.5. Microbiologie du *lben*

L'étude de la microflore de *lben* faite par (HARRATI, 1974 cité par AISSAOUI ZITOUN, 2004) a permis de dégager les remarques suivantes :

- Les streptocoques lactiques représentent le groupe bactérien quantitativement le plus important. Le *lben* renferme des streptocoques lactiques homo et hétérofermentaires dont *Streptococcus lactis*, *Streptococcus crémoris* ;
- Le barattage et le mouillage diminuent brutalement le nombre de germes mésophiles et surtout des streptocoques lactiques et diminuent aussi l'acidité ;
- Les lactobacilles sont en nombre très faible ou nul ;
- Les levures et les moisissures forment environ 0,5% de la flore mésophile totale ;
- Les streptocoques fécaux et *E.coli* sont en nombre très important, ceci témoigne une forte contamination intestinale. Salmonelle et Shigelle sont en nombre très faible.

Au Maroc, une étude de la flore microbienne impliquée dans la fermentation du lait pour produire le « *lben* » a montré que les bactéries lactiques mésophiles sont responsables de la fermentation lactique et du développement de l'arôme dans le « *Lben* », elles peuvent atteindre 10^8 CFU.ml⁻¹(TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983)

6. Méthodes de caractérisation de l'écosystème microbien

Traditionnellement, la plupart des connaissances de diversité bactérienne dans les écosystèmes microbiens proviennent à partir des études basées sur la croissance des microorganismes sur des milieux sélectifs et leur identification ultérieure, en utilisant la caractérisation phénotypique. Bien que ces méthodes peuvent être assez sensibles, ils ne permettent pas toujours la discrimination des espèces ou des souches, ni la détection des

relations phylogénétiques entre certains groupes des bactéries (JUSTÉ *et al.*, 2008). Ainsi, l'application des nouvelles approches moléculaires basées sur l'analyse directe de l'ADN ou (ARN) dans son milieu, sans culture préalable des microorganismes permettent de décrire les écosystèmes microbiens et étudier leur dynamique (GODON *et al.*, 2001; RANDAZZO *et al.*, 2002).

Dans le but de bien étudier l'ensemble de la diversité et de la complexité d'un écosystème microbien (cultivable ou non), il est indispensable de combiner l'approche culture dépendante avec des méthodes moléculaires directes (culture indépendante) (JANY et BARBIER, 2008).

6.1. Approche classique (culture dépendante)

Avant la maîtrise des outils de biologie moléculaire, l'identification de la flore microbienne était uniquement basée sur des caractères phénotypiques, c'est à dire la connaissance des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques des isolats obtenus. Le préalable requis à toute identification phénotypique était bien sur la nécessité d'isoler et de cultiver les microorganismes composant l'écosystème étudié et, par conséquent, de bien choisir les milieux de culture, la température d'incubation et le pH afin d'obtenir la diversité microbienne la plus proche possible de la réalité. Les limites de ces méthodes sont désormais bien connues. Elles sont d'abord, longues et fastidieuses, et sous estiment généralement la diversité réelle de l'échantillon, du fait de la prédominance de certains microorganismes ou de l'incapacité d'autres à se développer en dehors de leur environnement naturel (AMANN *et al.*, 1995). L'étude d'écosystèmes complexes implique donc l'utilisation de méthodologies capables de détecter l'ensemble de la diversité microbienne, qu'elle soit cultivable ou non.

6.2. Approche moléculaire (culture indépendante)

L'évènement de la biologie moléculaire et le développement de techniques d'extraction d'ADN permettant d'extraire l'ADN (ou ARN) présent dans l'écosystème microbien (JANY et BARBIER, 2008), a permis de produire une empreinte génomique à partir d'un produit PCR. Elle donne alors une image globale de la structure génétique de la communauté bactérienne. Les gènes cibles les plus utilisés lors de l'analyse de communautés microbiennes sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARN 16S, les propriétés phylogénétiques du 16S ainsi que le nombre important de séquences disponible représentent des avantages considérables (JANY et BARBIER, 2008). Les gènes bactériens codant pour l'ARN 16S contiennent 9 régions hypervariables V1-V9, dont la diversité de séquence diffère de manière importante selon l'espèce (BAKER *et al.*, 2003).

6.2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une réaction qui permet l'amplification de fragments d'ADN de manière exponentielle (BRANGER *et al.*, 2007). Cette méthode implique qu'une partie de la séquence d'ADN à amplifier soit connue. Elle utilise deux extrémités de la séquence à amplifier, chaque oligonucleotide se fixe à l'un des deux brins. Ceux-ci servent d'amorce à l'ADN polymérase, aboutissant à un doublement de la séquence considérée (DE VERNEUIL, 2003). La PCR permet de générer des dizaines de milliard des exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel) (MICHEL et MOLLER, 2006).

L'amplification de l'ADN par PCR se divise en trois principales étapes: dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces à l'ADN matrice et polymérisation de l'ADN. Ces trois étapes forment ce qu'on appelle un "cycle de PCR (BRODEUR et TOUSSAINT, 2007).

L'emploi d'un thermocycleur automatisé permet de répéter ce cycle généralement de 25 à 40 fois (selon la matrice, de quelques secondes jusqu'à quelques minutes par cycle) (SCHEMID, 2005).

a-Dénaturation de l'ADN

La dénaturation vise à séparer les deux brins complémentaires des molécules d'ADN, afin de permettre l'hybridation subséquente des amorces sur l'ADN simple brin. Pour ce faire le mélange d'ADN est chauffé à 95°C. Les liaisons d'hydrogène entre les bases azotées des deux brins de l'ADN ne sont pas suffisamment résistants pour conserver la structure en double hélice de la molécule dans le cas d'une telle augmentation de la température, de sorte que l'ADN se retrouve sous forme simple brin (BRODEUR et TOUSSAINT, 2007).

b- hybridation des amorces

À la suite de la dénaturation, la température s'abaisse suffisamment pour permettre la renaturation de l'ADN, c'est à dire le retour à la forme double brin. Des amorces, complémentaires aux extrémités de l'ADN à amplifier, sont présentes dans le mélange réactionnel en concentration très élevée par rapport à l'ADN matrice. Ainsi, au moment de l'abaissement de la température, très peu de molécules d'ADN originales seront reformées ; puisque l'hybridation entre un fragment de l'ADN matrice et une amorce complémentaire en excès sera favorisée (BRODEUR et TOUSSAINT, 2007).

C -Polymérisation

Après hybridation, la température remonte à 72°C afin de permettre l'élongation des amorces appariées à l'ADN matrice, grâce à une enzyme thermostable qui synthétise de l'ADN (BRODEUR et TOUSSAINT, 2007). La polymérase à ADN utilisée est la *Taq*

polymérase qui se lie aux ADN monocaténaire amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphate présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées (PRIMSON *et al.*, 2004).

6.2.2. Méthodes moléculaires directes (culture indépendante)

La PCR-TTGE et PCR-DGGE (*Polymerase Chain Reaction-denaturing gradient gel electrophoresis*, et *temporal temperature gel electrophoresis*) sont les techniques les plus utilisées pour évaluer la diversité microbienne et suivre la dynamique des population (OGIER *et al.*, 2002)

Ces techniques sont basées sur le principe de l'extraction directe de l'ADN totale présent dans l'écosystème étudié. Des fragments d'ADN sont amplifiés à l'aide des amorces universelles (JANY et BARBIER., 2008 ; RANDAZZO *et al.*, 2009).

L'analyse par TTGE/DGGE consiste à discriminer par électrophorèse des fragments d'ADN de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente. La séparation est basée sur le changement de mobilité électrophorétique de fragments d'ADN amplifiés migrant dans le gel verticale de polyacrylamide à des concentrations croissantes d'agents chimiques dénaturants (DGGE) ou en variant la température avec le temps (TTGE) (MUYZER et SMALLA, 1998 ; GIRAFFA et NEVIANI, 2001 ; ERCOLINI, 2004). Les fragments d'ADN, initialement à double brin, migrent en fonction de leur taille jusqu'à rencontrer des conditions qui dénaturent le domaine de fusion le moins stable. Leur migration s'en trouve alors fortement ralentie. La séparation des fragments dépend ainsi de leur température de fusion et donc de leur séquence nucléotidique plutôt que de leur taille (MYERS *et al.*, 1987; MUYZER *et al.*, 1998).

L'électrophorèse de DGGE est effectuée à une température constante, généralement entre 55°C et 65°C (ERCOLINI, 2004). Pour les espèces bactériennes de faible pourcentage GC (T_m de la région V3 inférieure à 75°C), la résolution optimale a été obtenue par TTGE, cependant pour les bactéries de moyenne et de haute pourcentage GC (T_m de la région V3 supérieur à 75°C), la meilleure séparation est obtenue par DGGE (OGIER *et al.*, 2004).

La DGGE et la TTGE sont des méthodes de choix quand l'information désirée ne doit pas être aussi phylogénétiquement approfondie. Ces techniques permettent la détection des espèces dominantes, la surveillance des changements temporels de structure de la communauté microbienne (l'écosystème considéré) et fournissent une vue simple des espèces microbiennes dans un échantillon (OGIER *et al.*, 2004).

L'un des avantages de ces techniques est que l'on peut également exciser du gel des bandes individuelles d'ADN, les séquencer et les accéder ainsi directement à l'identification des microorganismes par interrogation dans les bases de données. La co-migration des bandes de différentes espèces est toutefois la limite de ces méthodes, en particulier pour l'étude des écosystèmes complexes (HENRI-DUBERNET *et al.*, 2004).

7. Méthodes de caractérisation des surfaces

7.1. Microscope électronique à balayage

Microscope électronique à balayage (MEB ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) constitue une source importante d'information morphologique souvent indispensables à la compréhension des propriétés de la surface (SKOOG *et al.*, 2003). Comme le schématise la figure 4, un microscope électronique à balayage est constitué de :

- une colonne maintenue sous un vide suffisant (secondaire et éventuellement ionique au niveau du canon) ;
- une source d'électrons ;
- un dispositif de haute tension, accélérateur des électrons, destiné à former un pinceau fin et intense ;
- un condenseur final (appelé généralement « objectif ») et un diaphragme de petit diamètre qui permet de focaliser sur la surface à examiner un fin pinceau d'électrons presque parallèle ;
- un dispositif de déflexion piloté par un générateur de balayage ;
- une platine porte-objet mobile ;
- un détecteur d'électrons (principalement secondaires) et un dispositif d'amplification du signal, rapide et à faible bruit ;
- un système de visualisation d'image couplé de manière synchrone au même générateur de balayage (PAQUETON et RUSTE, 2006)

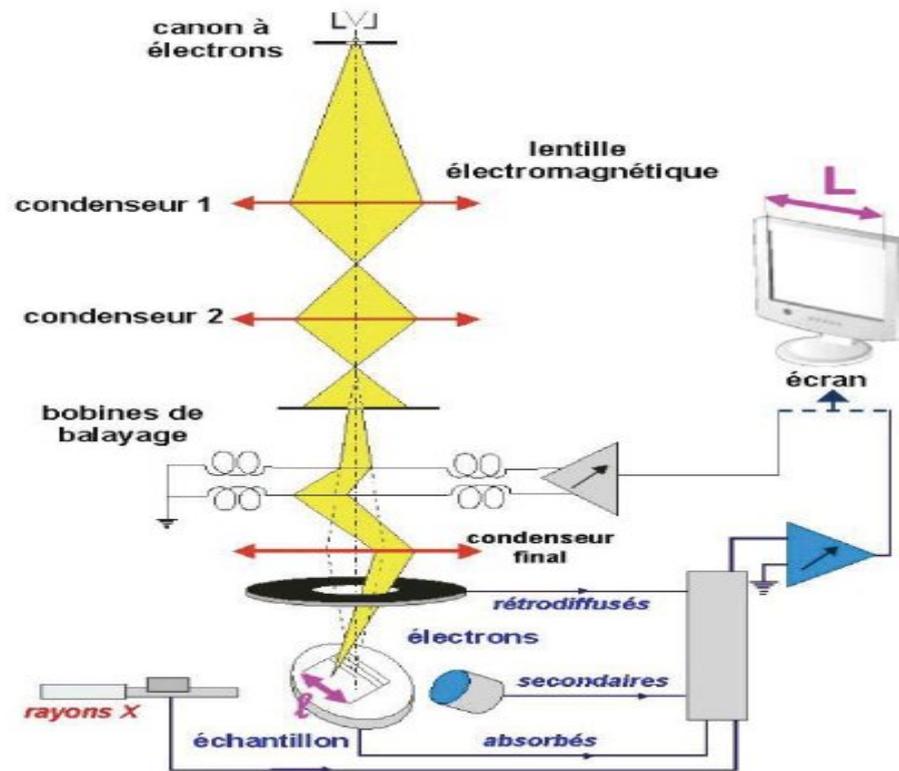


Figure 4. Principe de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (MANIGUET *et al.*, 2008)

7.1.1. Principe de fonctionnement du MEB

Dans le microscope électronique à balayage, le faisceau fin d'électron incident, issu du canon à électron balaie la surface de l'objet en mode convergent par le déplacement séquentiel de la sonde électronique sur l'échantillon (grâce à des bobines défectrices). Ce déplacement est associé à la transmission simultanée et synchronisée du signal issu de l'échantillon sur l'écran (comme en télévision). Chaque point de l'écran correspond à un point de la sonde sur l'échantillon (AYACHE *et al.*, 2007).

Lorsque le faisceau d'électron pénètre dans un échantillon solide. Il subit un certain nombre d'interactions, élastiques et inélastiques. Les interactions élastiques qui dévient les électrons de leur trajectoire sans leur faire perdre d'énergie ; les interactions inélastiques, entraînant un transfert d'énergie des électrons incidents à la cible conduisant à l'émission des particules secondaires (PAQUETON et RUSTE, 2006)

La microscopie électronique à balayage est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires : émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5nm et une grande profondeur de champ. Elle utilise en

complément, les autres interactions des électrons primaires avec l'échantillon : émergence des électrons rétrodiffusés, absorption des électrons primaires, ainsi l'émission de photons X et parfois celle des photons proches du visible. Chacune de ces interactions est souvent significative de la topographie et/ou de la composition de la surface (PAQUETON et RUSTE, 2006).

7.2. Microscope confocal à balayage laser (MCBL)

Le microscope confocal (figure 5) est un microscope dont la source lumineuse est un laser et qui permet, grâce à un montage optique particulier, d'obtenir uniquement l'image du plan sur lequel la mise au point a été faite. Il permet l'étude de la viabilité des bactéries dans les échantillons biologiques. Le principe d'identification des bactéries mortes et vivantes repose sur l'incorporation sélective de sondes fluorescentes qui marquent l'ADN des bactéries. Selon l'état des parois (indirectement de la viabilité), la sonde pénètre au pas.

Les principales sondes utilisées sont :

- l'*iodure de propidium* (fluorescence rouge) ou le *syto green* (fluorescence verte) qui entre seulement quand la paroi est dégradée ;
- le *Dapi* (fluorescence bleue), le *syto 9* (fluorescence verte) qui marquent les bactéries vivantes (CHEVROU et ROUDIERE, 2004).

7.2.1. Principe de la microscopie confocale

Les rayons d'un faisceau laser sont réfléchis, par un miroir dichroïque, en direction du spécimen. Ce faisceau balaie point par point un plan de spécimen. Les photons diffractés traversent un diaphragme situé dans le plan focal du système optique (d'où l'adjectif confocal pour qualifier ce microscope) : les photons parasites sont donc éliminés tandis que ceux qui traversent le diaphragme gagnent un détecteur de photons relié à un ordinateur. Un moniteur permet de voir l'image numérisée du plan balayé par le faisceau laser. Il est possible de balayer, plan par plan, l'objet à étudier et d'en obtenir des reconstitutions tridimensionnelles (MAILLET, 2006)

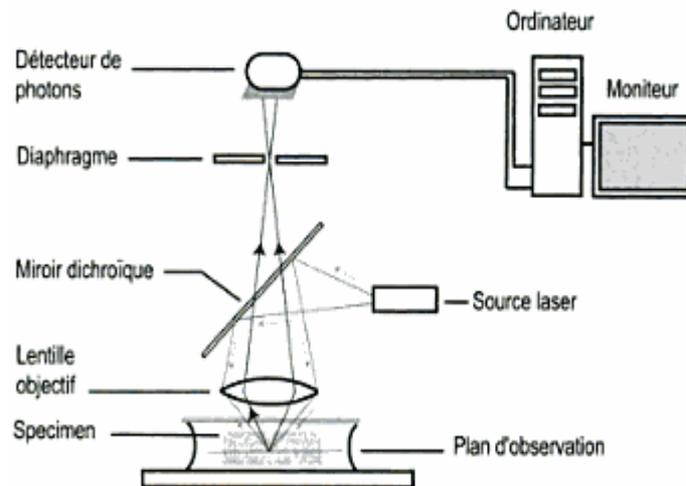


Figure 5. Schéma de principe de la microscopie confocale (MAILLET, 2006)

Un rayon laser balaie très rapidement tous les points du plan focal. L'image de chacun de ces points est captée par un détecteur de photons, numérisée et transmise à un ordinateur (associé au microscope). Il est ainsi possible d'observer une cellule ou une structure cellulaire plan par plan et d'obtenir par reconstitution une image tridimensionnelle : cette technique porte le nom de tomographie photonique (MAILLET, 2006).

*Matériels et
Méthodes*

La partie expérimentale de notre travail vise l'étude de la *chekoua* destinée pour la fabrication du fromage *bouhezza* selon deux aspects : la caractérisation de l'écosystème microbien et la microstructure de la peau de chèvre. En effet, les propriétés de la peau de chèvre et son mode de préparation et de conservation sont très importants pour la fabrication du fromage *bouhezza* et pour la conservation de cette tradition.

Notre pratique a été réalisée dans le centre de recherche le *CorFiLaC* (*Consorzio Ricerca Filiera Lattiero-Casearia*) situé à Ragusa-, Sicile, Italie (période : mai et de juin 2011). Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet 1.2 Algérie « Développement de la filière laitière et Fromagère en Algérie ». Le *CorFiLaC* est un centre de recherche de la filière laitière et fromagère dont la tâche principale est la recherche et le développement du secteur du lait et des fromages siciliens. Il s'intéresse aux fromages traditionnels et à leur préservation.

Notre expérimentation se résume dans les étapes suivantes :

1. Préparation de quatre sacs en peau de chèvre (*Chekouates*) et fabrication artisanale du *Lben* pour la préparation.
2. Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre après son traitement avec du sel et du genièvre et après un dernier rinçage avec du *lben* comme décrit le procédé traditionnel. Deux sacs frais et deux autres déshydratés ont été étudiés pour déterminer la microflore initiale de la peau et l'effet du contact avec le *lben*.

1. Matériels et matières premières

1.1. Peau de chèvre et préparation des *Chekouates*

Deux peaux entières de chèvre, âgées respectivement de 6 et 12mois ont été récupérés après abattage de la ville d'AinFakroun (Oum El Bouaghi). Elles ont été utilisés pour la confection de petits sacs en peau de chèvre « *chekouates* ».

La préparation et le traitement des peaux entières sont illustrés dans les figures 6 et 7. Après abattage, les peaux ont été placées dans un sac en plastique pour favoriser la putréfaction et laisser pendant 5 j à température ambiante. Les deux peaux ont été dépilées par arrachage manuel et lavées dans l'eau. Ensuite, elles ont été enduites sur les deux faces avec un mélange de sel et de genièvre et laisser pendant environ une semaine.

Chaque peau a été découpée à l'aide d'un couteur en deux (Figure 6) pour confectionner deux sacs similaires. Deux sacs ont été maintenus frais pour analyse peaux fraîches (PF1, PF2) et deux autres ont été séchés par déshydratation à l'air. Une fois séchés, ils doivent être réhydratés une nuit avant leur utilisation et servis à l'analyse des peaux sèche (PS1, PS2).



Figure 6. Schéma représentatif des différentes étapes de préparation de la peau de chèvre

Pour la confection des sacs, tout d'abord, la peau est ajustée en la découpant transversalement au niveau de sa grande ouverture postérieure. Ensuite, couture du morceau de peau à partir du cou jusqu'au fond postérieur. La fermeture du fond postérieur est assurée en enroulant la peau autour d'un bâtonnet en bois qu'on attache et on serre avec de la ficelle. La peau est retournée et la face externe est celle de la chair.

Selon le procédé traditionnel, la *Chekoua* peut être utilisée directement après nouaison ou séchée et conservée avec le sel et le genièvre plusieurs mois. Après déshydratation

complète, l'utilisation de la *chekoua* nécessite un simple trempage dans l'eau durant une nuit jusqu'à ramollissement de la peau. Aussi, et avant de lancer la fabrication de *Bouhezza*, la *chekoua* doit être mise en contact avec du *Lben* (environ 2 L) pendant une nuit puis, ce *Lben* sera jeté et la *chekoua* est à nouveau rincée avec l'eau. La figure 7 représente les dernières étapes de la préparation des différents échantillons pour l'analyse avant et après contact avec du *lben*.

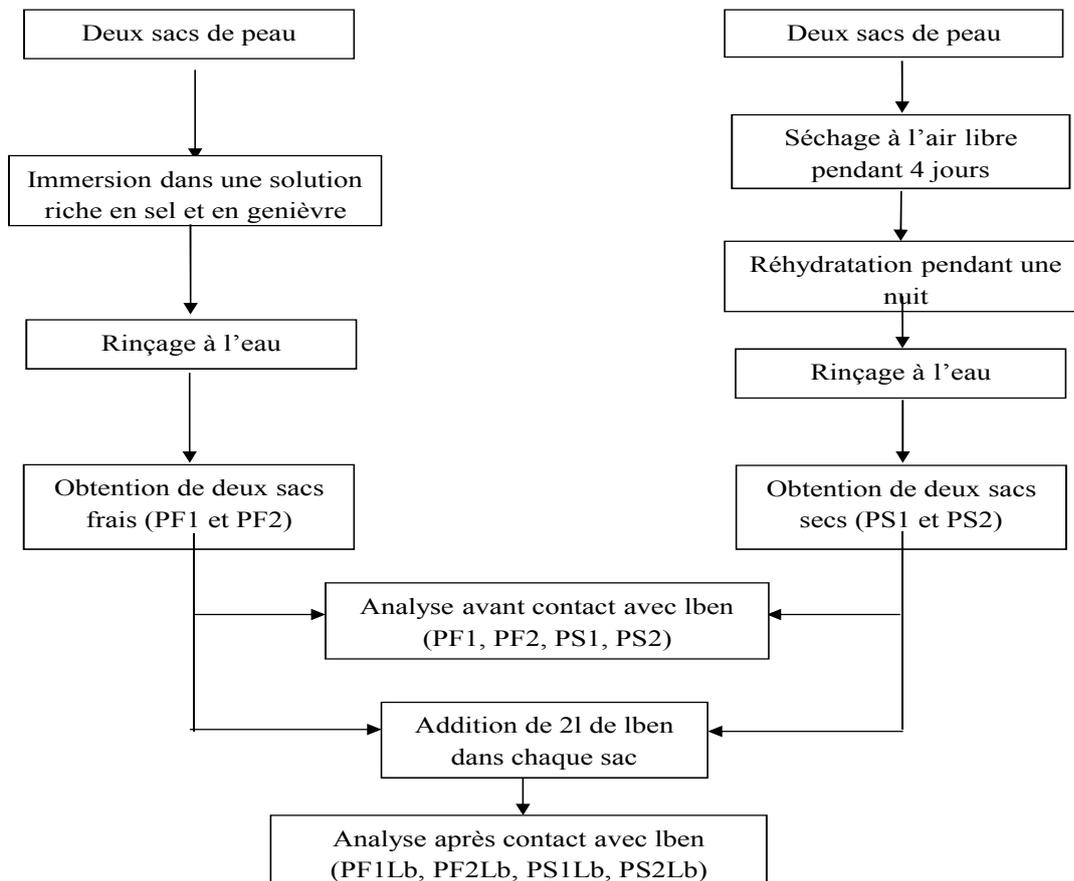


Figure 7. Schéma représentatif des différentes étapes d'obtention des échantillons

1.2. Lait et obtention de *lben*

Le lait utilisé (10 L) pour la préparation du *lben* a été collecté au niveau de deux fermes à Ragusa (Sicile, Italie). La première ferme «*TuminoEmanuele*» est située sur la rue *C.da Piano Materazzi* disposant d'un troupeau de vaches de même race (Modicana) et la deuxième ferme «*Tumino Salvatore*» est située sur la rue *C.da Cardita* disposant d'un troupeau de vaches de différentes races (Puntata Rossa, Bruna, Frisona). Après la traite, le lait est réfrigéré jusqu'à son arrivée au *CoRFiLaC*.

Le lait de mélange est transporté dans un bidon en plastique stérilisé avec l'eau chaude juste après la traite.

Le *Lben* a été préparé au niveau du laboratoire de la production fromagère au *CoRFiLaC* selon le diagramme artisanal Algérien (figure 8). Le lait de mélange est transvasé dans un récipient inoxydable et laissé pour la fermentation spontanée.

Le «*Raïb*» obtenu est versé dans un bidon en plastique pour effectuer le barattage manuel. Le bidon est bien fermé et secoué vigoureusement durant 45 min. La formation des globules gras (beurre) est jugée par le changement du son qui se produit à l'intérieur du bidon. Pour aider l'agglomération des particules du beurre, ½ litre d'eau froide est ajouté à trois reprises. Le beurre frais (85-100g) est retiré à l'aide d'une écumoire.

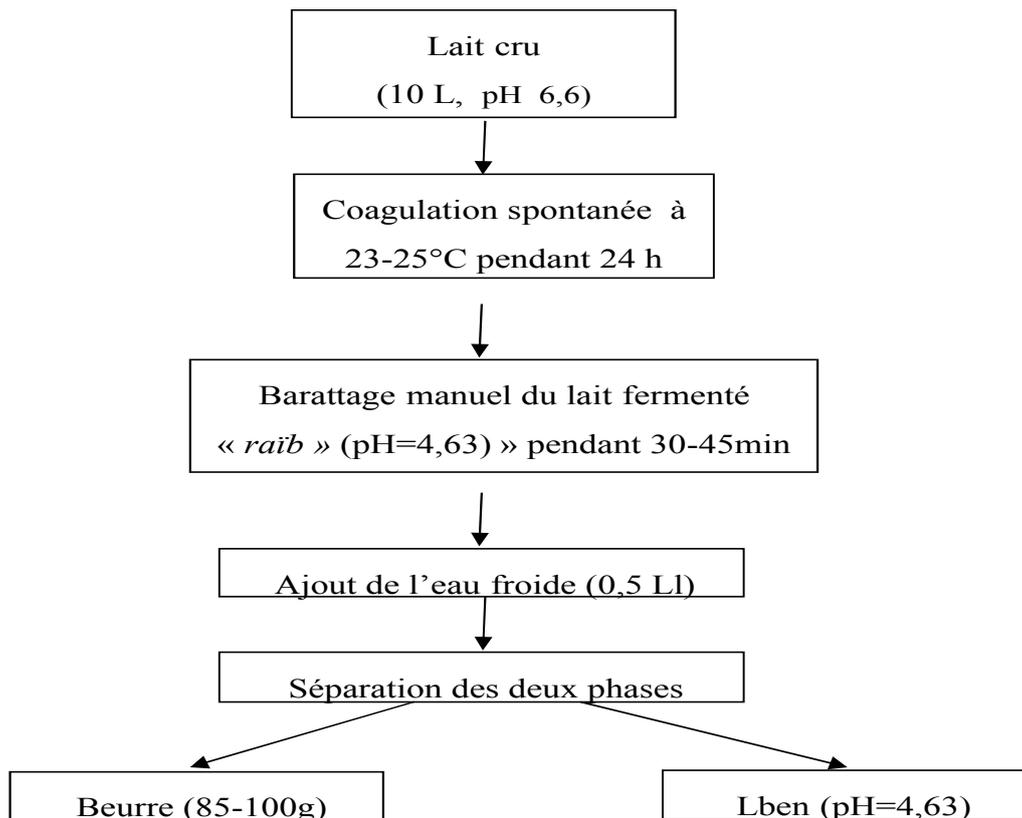


Figure 8. Diagramme de fabrication artisanal du *lben* (AISSAOUI ZITOUN, 2004)

1.3. Genièvre

Pour la préparation des peaux nous avons utilisé le genièvre de Phénicie séché, vendu dans le commerce sous forme de mélange d'écorce, baies et fruits. Le fruit est de couleur pourpre et de taille moyenne le mélange est utilisé après broyage.

1.4. Sel

Le sel utilisé pour le traitement des peaux iodé de table produit et traité par l'entreprise nationale TELDJ EL-OUED de granulométrie fine.

2. Caractérisation physicochimique du lait et du *Lben*

2.1. Caractérisation physicochimique du lait

L'analyse des principaux constituants du lait a été réalisée à l'aide de Milko ScanTM Minor6, le principe de fonctionnement de cet appareil est basé sur la spectroscopie à moyen infrarouge. L'échantillon du lait (100ml) a été chauffé à 39-40°C. Le lait doit être homogénéisé afin de réduire la taille des globules gras de 1µm pour diminuer l'effet de diffusion de la lumière par la matière grasse. Il est ensuite pompé dans une cellule ayant un pas optique qui peut varier de 0.01-1.0 mm et le faisceau infrarouge passe au travers de cette cellule. Les différents constituants du lait absorbent les rayonnements infrarouges à différentes longueurs d'ondes (AMIOT *et al.*, 2002)

Les résultats sont fournis en 90 secondes et affichés sur l'écran. La teneur en matière grasse, protéines, lactose, extrait sec total(EST), extrait sec dégraissé (ESD) sont exprimés en pourcentage (%). La précision des résultats est conforme à la méthode de références (AOAC 972.16).

2.2. Caractérisation physicochimique du *lben*

2.2.1. Détermination de pH

Les valeurs de pH de *lben* préparé ont été données automatiquement à l'aide de deux pH mètre thermomètres portatif. Deux pH mètres ont été utilisés pour mesurer le pH de *lben* dans chaque sac

2.2.2. Détermination de l'acidité titrable

La méthode de détermination de l'acidité par titrage permet de quantifier la teneur totale d'acide lactique présent dans le *lben* (AMIOT *et al.*, 2002)

La méthode (MET-L007) permet la détermination de degré d'acidité du *lben* exprimé en degré Soxhlet Henkel (°SH). Le degré d'acidité selon Soxhlet Henkel correspond au nombre de ml de soude caustique 0,25N nécessaire à la titration de 100ml du *Lben* jusqu'au virage de la phénolphtaléine. Un degré Soxhlet Henkel (°SH) est l'équivalent à 0,225g d'acide lactique dans 1 litre de *Lben*. Il correspond à 2,25 °D.

- Expression des résultats

L'acidité exprimée en degré Soxhlet Henkel est donnée par la formule suivante

$$(\text{°SH}) = \frac{V_{\text{NaOH}}(\text{ml}) \times N(\text{eq/L}) \times 100}{V(\text{ml}) \times 0,25}$$

V_{NaOH} : volume de la solution de NaOH utilisé pour la titration.

N : normalité en équivalent par litre de NaOH titrant (0,1016).

V : volume de l'échantillon du lait en millilitre (10ml).

2.2.3. Détermination de l'extrait sec total (EST)

La matière sèche correspond au poids du résidu restant après dessiccation du produit par étuvage à $100 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 4 heures. La détermination de l'extrait sec total du *lben* a été effectuée selon la méthode décrite par (HOOI *et al.*, 2004).

Deux millilitres du *lben* homogénéisé ont été pesés à 10^{-4} de près et la matière sèche est exprimée en pourcentage pondéral selon la formule suivante :

- Expression des résultats

$$EST = \frac{D - C}{A - C} \pm B \times 100$$

C : poids de la soucoupe vide

D : poids de la soucoupe+ poids de résidu sec.

A : poids de la soucoupe+ poids de l'échantillon en gramme.

Le résultat est la moyenne de quatre déterminations par échantillon.

B : essai à blanc

2.2.4. Dosage de la matière grasse

La teneur en matière grasse est déterminée par la méthode acidobutyrométrique de GERBER (AFNOR, 1993). Cette méthode est basée sur l'attaque acide des éléments du produit (par H_2SO_4 de densité 1,820), excepté la matière grasse, puis centrifugation pendant 10 minutes à 600 tr/minutes.

La séparation de la matière grasse en couche claire et transparente est favorisée par addition de 1ml d'alcool amylique. La prise d'essai est de 11ml de *lben*.

- Expression des résultats

La teneur en matière grasse exprimée en grammes pour 100g ou 100ml de *lben* est effectuée par lecture directe sur l'échelle du butyromètre. Chaque centimètre correspond à 10g de matière grasse par litre. Le résultat est exprimé par la valeur moyenne de deux mesures.

2.2.5. Dosage des protéines

La détermination de la matière azotée est effectuée selon la méthode KJELDAHL (ISO/TS 17837 IDF/RM25, 2008).

La prise d'essai est digérée avec le mélange d'acide sulfurique concentré et de sulfate de potassium. Le sulfate de cuivre est employé en tant que catalyseur de la réaction de conversion de l'azote organique présent dans l'échantillon au sulfate d'ammonium. Le rôle de sulfate de potassium est d'élever le point d'ébullition de l'acide sulfurique. L'hydroxyde de sodium est ajouté pour libérer l'ammoniac. Sous l'action de la chaleur. L'ammoniac se libère

de son sel et se condense sous l'action du réfrigérant circulant en continu et il est entraîné par la vapeur surchauffée pour être ensuite récupéré dans une solution d'acide borique et titré par une solution volumétrique standard d'acide chlorhydrique.

Cinq millilitres de *lben* sont introduits dans des tubes de minéralisation avec 12g de sulfate de potassium K_2SO_4 , 1ml de solution de sulfate de cuivre 5 fois hydraté ($Cu_2SO_4 + 5H_2O$) (5%) et 20 ml d'acide sulfurique (densité 1,84 g/ml). Les tubes sont placés sur une rampe de chauffage, et vers 430°C le liquide devient limpide et la minéralisation est arrêtée (la durée de minéralisation est 4 heures). Le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ est le résultat essentiel de la minéralisation.

Au cours de la distillation (appareil DÜCHI Distillation Unit K-350), une base forte (NaOH, 40%) est ajoutée en volume égal au volume d' H_2SO_4 pour le faire réagir selon la réaction suivante :



L'hydroxyde d'ammonium formé (NH_4OH) est entraîné par la vapeur d'eau est récupéré dans un Erlen Meyer de titrage contenant 50mL d'une solution standard d'acide borique à 4% et d'un indicateur coloré. L'indicateur coloré est un mélange d'un volume de rouge de méthyle avec 5 volumes de vert de bromocresol.

Le borate d'ammonium formé ($(NH_4)_3BO_3$) fait augmenter le pH de la solution qui est ensuite titrée par l'acide chlorhydrique. La manipulation est répétée deux fois pour le même échantillon et la moyenne des deux valeurs obtenues donne la teneur en azote de *lben*.

-Expression des résultats

La teneur en azote, exprimée en pourcentage par unité de masse est calculée selon la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{14 \times (V_s - V_b) N \times 100}{m}$$

D'où

V_s = Volume de HCL nécessaire pour titrer la solution de l'échantillon (ml).

V_b = Volume de HCL nécessaire pour titrer le blanc (permet d'éliminer les interférences possibles occasionnées par les différents réactifs).

N = normalité de la solution de HCL exprimée en mole/1000ml.

m = masse en grammes de l'échantillon

14 = masse moléculaire de l'azote (g d'azote/mol)

Un facteur de conversion moyen de 6,38, multiplié par le pourcentage d'azote, permet d'obtenir la teneur en protéines (%).

2.3. Suivi de l'évolution du pH et de la température du lait au cours de la fermentation

Le suivi de pH et de température de lait durant la fermentation sont effectués à l'aide de deux pH-mètres thermomètre portatifs (pH/mV METER HD 2105.2. Laboratoire Nephrotek, Rungis, France). Les valeurs enregistrées peuvent être transférées à un ordinateur et seront traduites sous forme de courbes contrôlant la variation de la température et du pH en fonction du temps de la fermentation.

2.4. Suivi de l'évolution de pH et de l'acidité titrable du *Lben* pendant son séjour dans les *chekouates*

Le suivi de pH et de l'acidité titrable du *Lben* durant son séjour dans les *chekouates* a été réalisé à temps 0, 30, 60, 120min et après 16h de contact. Les résultats sont exprimés sous forme de courbes.

3. Caractérisation microbiologique du lait, *Lben* et *chekouates*

Cette caractérisation a concerné le lait, les différents échantillons de *Lben* (prélevés à temps 0, 30, 60, 120min et après 16heures de contact avec les *chekouates*) et les différents échantillons de peau de chèvre (PF1, PF2, PS1, PS2, PF1Lb, PF2Lb, PS1Lb, PS2Lb).

L'analyse microbiologique a été réalisée par deux approches : la première consiste à un dénombrement des principaux groupes microbiens sur des milieux sélectifs et la deuxième visant l'accès à l'identification de l'écosystème microbien à l'aide d'une technique de la biologie moléculaire PCR-TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*).

3.1. Mode de prélèvement des échantillons

3.1.1. Lait

Le lait est prélevé dans des conditions aseptiques, 70ml sont prélevés pour l'analyse microbiologique classique, 40ml pour l'identification des bactéries par PCR-TTGE et 80 ml pour la recherche des pathogènes.

3.1.2. *Lben*

Soixante dis millilitres de *Lben* ont été prélevés pour l'analyse microbiologique et 40ml pour l'identification par la PCR-TTGE.

Deux litres de *Lben* sont versés dans chaque sac de peau de chèvre en utilisant un entonnoir. Les prélèvements des échantillons de *Lben* sont effectués aseptiquement après 30, 60, 120min et une nuit (16-17 h) de contact avec la peau de chaque sac en utilisant une pipette qui aspire le *Lben* directement du sac suivant le plan indiqué dans le tableau 3.

Tableau 3. Volumes des échantillons de *Lben* prélevés.

Analyse Lben (ml)	Microbiologie classique				PCR-TTGE			
	30min	60min	120min	16-17h	30min	60min	120min	16-17h
PF1	70	70	70	70	40	40	40	40
PF2	70	70	70	70	40	40	40	40
PS1	70	70	70	70	40	40	40	40
PS2	70	70	70	70	40	40	40	40

PF1 sac frais 1, **PF2** sac frais 2, **PS1** sac sec1, **PS2** sac sec 2.

3.1.3. Peau de chèvre

Le biofilm de chaque peau a été prélevé en respectant les conditions d'asepsie avant et après contact avec le *lben* à l'aide de trois écouvillons humidifiés d'eau peptonée en frottant trois zones différentes (partie antérieure A, partie centrale B, partie postérieure C) de la face dorsale de chaque sac (figure 9) afin d'avoir une vision globale de la population microbienne de la peau de chèvre. Chaque zone est d'une aire de 100cm² délimitée avec un carré en plastique préalablement stérilisé sous UV dans une hotte à flux d'air laminaire.

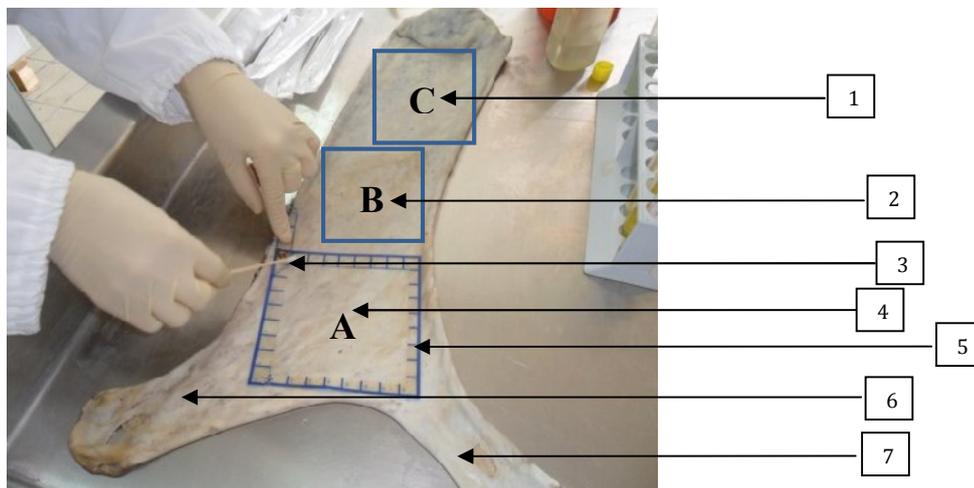


Figure 9. A, B, C zones de prélèvement de biofilm (vue dorsale) de la peau de chèvre

1) partie postérieure C, 2) Partie centrale B, 3) Écouvillon, 4) Partie antérieur A, 5) Carré d'une surface de 100cm², 6) Le cou, 7) Membre antérieur.

Après prélèvement, les trois écouvillons ont été mis dans 50ml d'eau peptonée. Cette solution est sujette aux analyses microbiologiques classiques et PCR-TTGE. Les colonies

formées sont comptées et les résultats sont exprimé en UFC/ 300cm² (Unité Formant Colonie/300cm²).

Pour la détection de bactéries pathogènes, après prélèvement, l'écouvillon est mis dans un tube de 10ml contenant le milieu de pré-enrichissement convenant au type de bactérie recherchée (*Salmonella*, *Listeria monocytogene*, *Escherichia coli O157:H7*) et les résultats seront présentés par le système BAX[®] selon la présence ou l'absence des pathogènes (négative ou positive) dans une aire de 300cm² de peau.

3.2. Dénombrement des principales flores

Les flores microbiennes dénombrées sont les suivantes : Flore totale aérobie mésophile (FTAM), flore lactique (lactobacille et lactocoque), levures et moisissures, entérobactéries et *Staphylococcus aureus*

Pour la numération bactérienne des principales flores (du lait, *lben*, et biofilm de la peau de chèvre avant et après contact avec *lben*), une série de dilutions décimales dans l'eau peptonée est effectuée. Il est souvent nécessaire d'aller jusqu'à 10⁻⁷ pour les dilutions du lait et du *lben*. L'ensemencement a été fait dans deux boîtes de Pétri pour chaque dilution et chaque milieu de culture.

3.2.1. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

Le dénombrement des germes totaux mésophiles a été réalisé selon la méthode BS EN ISO 4833. (2003). La gélose nutritive PCA (*Plat Count Agar*) (PCA, Oxoid CM032S) est ensemencée dans la masse et les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures. Les colonies apparaissent sous différentes tailles et formes.

3.2.2. Dénombrement des lactobacilles

Le milieu de culture et d'isolement de base des lactobacilles est le MRS (Man, Rogosa, Sharpe). Ce dernier est ensemencé en masse avec 1 ml d'inoculum et les cultures sont incubées à 37°C en anaérobiose en utilisant le système type « anaerocult A MERCK » pendant 24 heures. Pour l'isolement des souches bactériennes, le même milieu est ensemencé en surface avec 0,1ml de l'inoculum pour pouvoir caractériser et confirmer la forme des bactéries par observation microscopique de leur morphologie (**ISO 7889 IDF, 2003**).

3.2.3. Dénombrement des lactocoques

Le dénombrement est réalisé avec le milieu M17 (Oxoid, CM0785) selon la méthode **ISO 7889 IDF. (2003)**. Ce dernier est ensemencé en masse et les cultures sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Pour pouvoir isoler et confirmer la forme des bactéries sur microscope optique il est nécessaire d'ensemencer le même milieu en surface.

3.2.4. Dénombrement des levures et des moisissures

La présence de levures et de moisissures peut être à l'origine des accidents de fabrication ou de défaut de quelques produits laitiers. Leur dénombrement est effectué sur milieu gélosé Oxytétracycline-Glucose (OGYE, Oxoid CM0545), avec ajout de 20mL/L d'oxytétracycline à 5 mg/ml (Oxoid, SR0073). Le milieu est ensemencé dans la masse et incubé à 25°C pendant 5 jours. Toutes les colonies d'aspect lisse et filamenteux sont comptées (ISO 6611-IDF 94, 2004).

3.2.5. Dénombrement des entérobactéries

Le dénombrement des entérobactéries est effectué sur le milieu gélosé VRBG (Violet.Red.Bile.Glucose) selon la méthode (UNI ISO 21528-2, 2010). 1ml d'inoculum est déposé dans la boîte et la gélose en surfusion à 45°C est ajoutée et mélangée. Après solidification, une deuxième couche du milieu est coulée au-dessus (technique de double couche) et les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h±2h. Cinq colonies typiques (rouges, d'au moins 0,5mm de diamètre) ont été choisies et ensemencées sur gélose nutritive en surface par des stries puis elles sont incubées à 37°C pendant 24h±2h pour effectuer les tests de confirmation (test oxydase, fermentation du glucose).

Test de confirmation

Test oxydase

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne respiratoire pour catalyser la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « OX » imprégnés d'oxalates N-N-diméthylparaphénylène.

Les colonies isolées sont déposées sur le disque OX imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive (les entérobactéries sont des OX(-)).

Fermentation de glucose

Les colonies OX (-) sont ensemencées en profondeur dans des tubes contenant la gélose glucosée et incubées à 37°C pendant 24h±2h. La fermentation de glucose se traduit par le virage de la couleur du milieu vers le jaune à travers le tube (les entérobactéries fermentent le glucose).

3.2.6. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

La croissance des staphylocoques dans les aliments constitue un risque pour la santé publique parce que certaines souches appartenant principalement à l'espèce *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) produisent des entérotoxines dont l'ingestion provoque une Toxi-Infection Alimentaire (TIA) (DE BUYSER, 1991).

Le dénombrement des *Staphylococcus aureus* est réalisé sur le milieu gélosé de Baird-Parker selon la méthode (UNI EN ISO 6888-1, 2004), 0,1 ml d'inoculum est ensemencé en surface. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les positions de toutes les colonies typiques présentes ont été marquées sur le fond des boîtes qui ont été mises une deuxième fois dans l'étuve pendant 24 heures de plus à 37°C avec marquage de toutes nouvelles colonies.

Remarque : les colonies typiques sont noires, brillantes et convexes (1 à 1,5 mm de diamètre après incubation de 24h et 1,5 à 2,5 mm de diamètre après incubation de 48h) et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. Après plus de 24h d'incubation un anneau opalescent, immédiatement en contact avec les colonies, peut apparaître dans cette zone plus claire.

Test de confirmation (Test coagulase)

Cinq colonies typiques ont été sélectionnées sur chaque boîte de Pétri pour effectuer le test coagulase. Chaque colonie prélevée est ensemencée en profondeur dans un tube contenant le bouillon cerveau-cœur (BHI) et incubée pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, 0,1 ml de chaque culture a été ajouté à 0,3 ml de plasma de lapin contenu dans des tubes stériles de 10 mm × 75 mm et incubé à 37°C.

La coagulation du plasma est examinée après 4 à 6 heures. Parfois, la coagulation se produit plus lentement et peut aller jusqu'à 24 heures. La réaction est considérée comme positive lorsque le coagulum occupe plus de la moitié de volume initialement mis en jeu.

A titre de témoin, 0,1 ml de BHI stérile a été additionné à la quantité recommandée de plasma de lapin et incubé. Pour que l'essai soit valable, le plasma témoin ne doit montrer aucun signe de coagulation.

3.3. PCR-TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*)

3.3.1. Principe

La technique d'électrophorèse sur gel polyacrylamide sous gradient de température dénaturant, est basée sur l'extraction directe de l'ADN microbien du lait (ou d'autres échantillons), et l'amplification de l'ADNr (codant l'ARN ribosomique 16S) à l'aide des amorces universelles. La TTGE est une méthode électrophorétique capable de détecter des différences entre les fragments d'ADN de même taille mais avec différentes séquences (PARAYRE *et al.*, 2007). Les fragments peuvent être séparés sur un gel de polyacrylamide par un gradient de dénaturation basé sur le profil différentiel de dénaturation des fragments d'ADN amplifié (ERCOLINI *et al.*, 2008). Le gradient de dénaturation est obtenu en variant la température en fonction du temps (JANY et BARBIER, 2008).

3.3.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique à partir du lait, *lben* et du biofilm de la peau de chèvre a été effectuée selon le protocole proposé par LICITRA *et al.* (2007). Un volume de 10 ml du lait (ou de lben) et un volume de 5ml de biofilm sont mis dans des eppendorf de 2 ml et centrifugés à 4000 rpm pendant 20min. A chaque échantillon, 400 μ L de tampon de lyse (20mM de tris HCL [pH=8], 2mM EDTA, 1,2% Triton X-100, 20mg/ml de lysozyme, 10 μ L/ml de mutanolysine à une concentration de 5U/ml) sont ajoutés après élimination du surnageant, puis incubés à 37°C pendant 1heure. Après incubation, 50 μ L de protéinase K à une concentration de 20mg/ml et 200 μ L de tampon AL sont ajoutés et mélangés doucement, pour une deuxième incubation à 70°C pendant 30min (le kit DNeasy[®] tissu contient les tampons : de lyse, protéinase K, AW1, AW2, AE, AL, et la colonne d'extraction).

Après incubation, 200 μ L d'éthanol absolu sont ajoutés à une température de 4°C à l'eppendorf et incubés pendant 5 minutes à température ambiante pour la précipitation de l'ADN. Le mélange obtenu dans l'Eppendorf est déposé dans une colonne d'extraction et centrifuger à 10000 rpm (centrifugeuse 5415 R) pendant 2 minutes à 20°C.

Le schéma ci-dessous (figure 10) représente une colonne d'extraction de l'ADN placée au-dessus d'un tube collecteur. Cette colonne est un filtre constitué d'une substance fixatrice de l'ADN (ayant une grande affinité chimique pour l'ADN). On fait passer la solution d'extraction de l'ADN à travers le filtre par le biais d'une centrifugation.

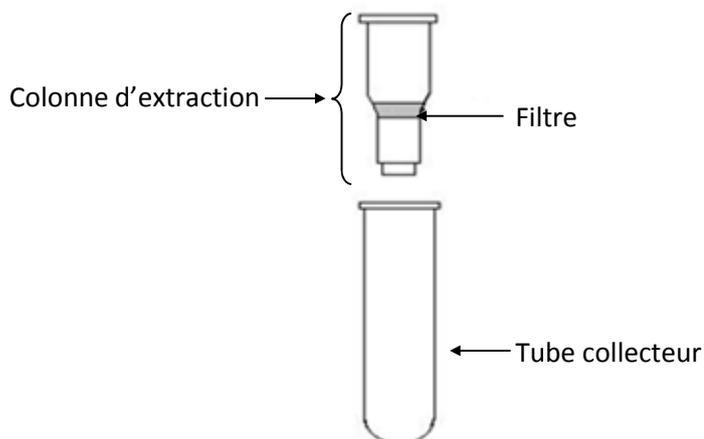


Figure 10. Schéma d'une colonne de fixation de l'ADN (colonne DNeasy)

La purification de l'ADN est effectuée selon les instructions de Kit (DNeasy tissu kit). Après centrifugation, la colonne d'extraction doit être placée au-dessus d'un nouveau tube collecteur de 2 ml où 500 μ L de tampon AW1 sont ajoutés et centrifugés à 10000 rpm pendant 2min à 20°C. La colonne est transférée dans un nouveau tube de collecte de 2 ml et 500 μ L de tampon AW2 sont ajoutés et centrifugés à 13000 rpm pendant 3min à 20°C.

La colonne est placée à nouveau dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml et éluée en déposant 200µL de tampon AE et après 2min d'incubation à température ambiante, le tube est centrifugé à 10000 rpm pendant 2 min à 20°C (c'est la première élution). Transférer la colonne dans un autre tube eppendorf et ajouter 200 µL de tampon AE, le tube est centrifugé à 10000rpm pendant 2 min à 20°C (c'est la deuxième élution), les échantillons sont conservés à 20°C jusqu'à utilisation.

3.3.3. Amplification de l'ADN génomique

L'amplification a été effectuée selon le protocole proposé par PARAYRE *et al.* (2007), la région V3 de L'ADN codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), est amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles V3P3-GC-Clamp(5'-GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTCGGGAGGCAGCAG-3') et V3P2(5'ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Sigma, Italie). Ces amorces donnent des produits de PCR d'environ 233 paires de base. Le milieu réactionnel (50µL) dans chaque tube de PCR est constitué de 40µL de Mix PCR (tableau 4), et 10µL de l'échantillon de l'ADN bactérien extrait à partir de lait, *Iben* ou de biofilm de la peau de chèvre.

Tableau 4. Composition du milieu réactionnel pour PCR (MixPCR)

Mix PCR	Quantité de chaque constituant par tube de PCR (µL)
H ₂ O	31,5
Tampon MgCl ₂ .	5
dNTPs(5mM)	2
Amorce V3P3-GC-C (100µM)	0,5
Amorce V3P2 (100µM)	0,5
<i>Taq</i> polymérase (5U /µL)	0,5µL (2,5U)

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (PTC-100TM, programmable thermique Controller). La réaction d'amplification consiste en une incubation à 94°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles. Chaque cycle est la succession de trois étapes : 30s de dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 63°C et 1min d'élongation à 72°C, suivie d'une extension finale de 5min à 72°C, et à la fin de la réaction la température se stabilise à 4°C.

3.3.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

La pureté et la taille des produits de l'amplification ont été vérifiées par une séparation sur gel d'agarose, le gel est préparé par l'addition de 1,5g d'agarose à 100mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE1X) (10,8g /L de Tris-HCl, 0,93g/L d'EDTA, 5,5g/L d'acide borique, et pH 8,3).

Le mélange est porté à ébullition pour faire fondre l'agarose, avant refroidissement, le gel doit être coulé. 3µL ont été prélevés du mélange (2µL du colorant de charge +5µL d'amplifiât) et déposés dans les puits de gel recouvert par le tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X). La migration est réalisée sous une tension de 100V pendant 35min dans une cuve de type Vary Gel (BIO-RAD) (exemple d'appareil voir annexe1). L'estimation de la taille des fragments est faite grâce à la comparaison avec l'échelle de marqueur de taille moléculaire (100-bp ADN ladder) (Fementas Life Science, Italie).

Les bandes d'ADN ont été révélées par trempage du gel dans une solution de bromure d'éthidium 2,5µg/L (qui se fixe à l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases) pendant 15 min et rinçage pendant 5 min dans l'eau et par photographie de la fluorescence orangée obtenue par irradiation Ultraviolet. (Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur orangée).

3.3.5. Préparation du gel de polyacrylamide et analyses en TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*)

Le gel utilisé est constitué d'un gel de séparation (*Resolving*) à 10% d'acrylamide et 7M d'urée, et d'un gel de concentration à 8% d'acrylamide (*Stacking*) dans lequel sont déposés les échantillons à analyser (Tableau 5).

Tableau 5. Composition des gels de séparation et de concentration

	Resolving	Stacking
Bisacrylamide 40%(37.5 :1).	6,25mL	2,1mL
TAE 50X (Tris-HCl 2M,Acide Acétique 1M, EDTA 50 mM)	0,625mL	175µL
Urée	10,5µL	/
Temed	25µL	7µL
Persulfate d'ammonium à 10%	250µL	70µL
H ₂ O distillée	10,25mL	7,35mL

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre où s'effectue la réaction de polymérisation. Les monomères d'acrylamide vont polymériser sous forme de chaîne de

polyacrylamide. Le N, N'-méthylènebisacrylamide permettra la formation des pores dans le gel. Des radicaux libres provenant du persulfate d'ammonium stabilisés par le TEMED sont les catalyseurs de la réaction de polymérisation (CHAUMANDE, 2011).

Dix µL de l'amplifiât de chaque échantillon sont mélangés avec 5µL de tampon de charge (0,05% bleu de bromophenol, 0,05% xylène cyanol, et 70% glycérol). Le mélange de chaque échantillon est alors déposé dans un puits de gel de concentration.

Le marqueur qui a été utilisé contient des amplifiâts de 12 souches (Tableau 6). 30µL de marqueur sont déposés par puits (Le marqueur est obtenu à partir des laboratoires INRA-Agrocompus Rennes, France).

Tableau 6. Les souches utilisées comme marqueur pour la PCR-TTGE

Souches	Volume de l'amplifiât
1- <i>Lactobacillus plantarum</i> CNRZ 211 ^T 2- <i>Lactobacillus fermentum</i> CNRZ 209 ^T 3- <i>Enterococcus faecium</i> LMG 8149 4- <i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ 137 5- <i>Enterococcus faecalis</i> CNRZ 137 13	13 µL
6- <i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 105 ^T 7- <i>Streptococcus thermophilus</i> CIP102303 ^T 8- <i>Corynebacterium moorparkense</i> CIP107183 ^T 9- <i>Lactobacillus paracasei</i> LMG9192	15 µL
10- <i>Arthrobacterium nicotianae</i> CIP 82.107 ^T 11- <i>Brevibacterium casei</i> CIP 102111 ^T 12- <i>Propionibacterium cyclohexanicum</i> TL1365 ^T	19 µL
Tampon de charge	25 µL

Les analyses en *Temporal Temperature Gel Electrophoresis* (TTGE) ont été réalisées avec le système universel de détection de mutation (BIO-RAD Laboratoires, Hercules, CA, USA), et la migration est réalisée sous une tension de 41V pendant 16h, avec un gradient de température de 63°C à 70°C, à raison de 0,4°C.h⁻¹.

Une fois l'électrophorèse achevée et le gel supérieur de concentration écarté après démoulage, l'ADN est coloré par immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium (0,6µl de bromure d'éthidium par 1ml de TAE 1,25X) pendant 15min. Le gel est ensuite immergé dans l'eau distillée pendant 30min. les bandes sont ensuite visualisées et photographiées par transillumination ultraviolette (E-Box 1000/26M, Euroclone,

Siziano, Italie). Les bandes ensuite sont analysées pour identifier les espèces correspondantes, par comparaison aux bases de données développées par PARAYRE *et al.*, (2007), à l'aide du programme BioNumerics, version 4,6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique). La base de données permet de comparer les bandes aux 54 espèces les plus fréquentes dans le lait et les produits laitiers, qui appartenant aux 18 genres (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*).

Tableau 7. Les espèces de la base de données, selon PARAYRE *et al.* (2007)

1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	26. <i>Escherichia coli</i>
2. <i>Lactobacillus johnsonii</i>	27. <i>Bifidobacterium breve</i>
3. <i>Lactobacillus gasseri</i>	28. <i>Hafnia alvei</i>
4. <i>Lactobacillus fermentum</i>	29. <i>Corynebacterium variabile</i>
5. <i>Leuconostoc cremoris</i>	30. <i>Corynebacterium flavescens</i>
6. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31. <i>Bacillus pumilus</i>
7. <i>Staphylococcus equorum subsp. linens</i>	32. <i>Microbacterium gubbeenense</i>
8. <i>Enterococcus faecium</i>	33. <i>Kocuria varians</i>
9. <i>Lactobacillus brevis</i>	34. <i>Lactobacillus reuteri</i>
10. <i>Staphylococcus xylosum</i>	35. <i>Bifidobacterium longum</i>
11. <i>Lactobacillus helveticus</i>	36. <i>Lactobacillus paracasei</i>
12. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	37. <i>Lactobacillus casei</i>
13. <i>Lactobacillus crispatus</i>	38. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
14. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	39. <i>Lactobacillus zeae</i>
15. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis</i>	40. <i>Brevibacterium infantis</i>
16. <i>Enterococcus faecalis</i>	41. <i>Corynebacterium casei</i>
17. <i>Staphylococcus succinus</i>	42. <i>Arthrobacter nicotianae</i>
18. <i>S. gallolyticus subsp. Macedonicus</i>	43. <i>Arthrobacter globiformis</i>
19. <i>S. taphylococcus carnosus subsp. carnosus</i>	44. <i>Brachybacterium tyrofermentans</i>
20. <i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>	45. <i>Propionibacterium microaerophilum</i>
21. <i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	46. <i>Brachybacterium alimentarium</i>
22. <i>Lactobacillus buchneri</i>	47. <i>Brevibacterium linens</i>
23. <i>Bacillus cereus</i>	48. <i>Propionibacterium acidipropionici</i>
24. <i>Bacillus licheniformis</i>	49. <i>Brevibacterium casei</i>

25. <i>Streptococcus thermophilus</i>	50. <i>Propionibacteriumjensenii</i> 51. <i>Propionibacteriumthoenii</i> 52. <i>Propionibacteriumfreudenreichii</i> 53. <i>Propionibacteriumcyclohexanicum</i>
---------------------------------------	---

3.4. Recherche des bactéries pathogènes par le système BAX[®]

La recherche des bactéries pathogènes dans le lait, le Lben et le biofilm des différents sacs avant (PF1, PF2, PS1, PS2) et après contact avec le Lben (PF1Lb, PF2Lb, PS1Lb, PS2Lb) a été effectuée en utilisant le système BAX[®].

3.4.1. Principe

Le system BAX[®] est une méthode automatisée qui utilise la technologie de réaction de polymérisation en chaine (PCR) pour la détection des pathogènes dans les aliments (FRANCHIN *et al*, 2006), et dans les échantillons environnementaux (ANONYME, 2007).

Le système BAX[®] combine la vitesse et la facilité d'utilisation avec la performance de donner des résultats rapides, précis et fiables (FRANCHIN *et al*, 2006). Il se concentre sur la réelle structure génétique des bactéries pour la détection d'un fragment d'ADN uniquement présent dans l'organisme cible. Il permet la détection des salmonelles, *Campylobacter*, *E.coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes*, *Genus listeria*, *Staphylococcus aureus*, levures et moisissures, *Vibrio*, *Enterobacter sakazakii* (ANONYME, 2007)

Le système BAX[®] est la première méthode qui utilise la technologie PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui crée rapidement des millions de copie de fragments d'ADN cible s'il est présent. Les réponses sont clairement détectées après des heures de début de test. Ce système simplifie l'utilisation de la PCR dans le laboratoire. Tous les réactifs nécessaires à la réaction sont regroupés en un seul comprimé, contenu à l'intérieur d'un tube (tube PCR). Ceci permet d'éliminer les transferts de liquides utilisés dans plusieurs autres méthodes et réduit efficacement le potentiel des erreurs provoquées par la technique de l'opérateur. Les propriétés des comprimés permettent également un traitement efficace d'un grand nombre des échantillons, jusqu'à 96 tests dans un seul lot (ANONYME, 2007).

Les comprimés contiennent notamment :

- Les nucléotides et la *Taq* polymérase.
- Des amorces spécifiques
- Un marqueur pour la détection par fluorescence des produits d'amplification.

Une fois le processus d'amplification par PCR se produit (dans le cas de présence de pathogènes), le marqueur ou bien le colorant fluorescent dans chaque comprimé des réactifs

de système BAX[®] s'est intercalé avec les fragments d'ADN double brin, et émet un signal fluorescent en réponse à l'excitation par la lumière. Le système BAX[®] commence la phase de détection lorsque le signal fluorescent est mesuré.

Lors de la détection, la température des échantillons est élevée au point où les brins d'ADN se séparent (dénaturation) en libérant le colorant et abaissant le signal. Ce changement de fluorescence peut être tracé en fonction de la température pour générer une courbe de fusion qui sera interprétée à l'aide d'un logiciel intégré (BAX[®]SystemQ7). Cette méthode de détection a été optimisée par des essais avec le système BAX[®] (ANONYME, 2007).

3.4.2. Pathogènes recherchés

La recherche et la détection de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157 : H7 ont été réalisés avec l'appareil BAX[®]System (Dupont Qualicon, UK).

Le protocole détaillé de la recherche est mentionné en (annexe 2). Il comprend pour chaque pathogène les mêmes trois étapes suivantes mais avec des réactifs spécifiques pour chaque pathogène:

- a) Pré enrichissement et enrichissement en milieu sélectif;
- b) Lyses des cellules (Kit spécifique du pathogène) et libération de l'ADN ;
- c) Amplification (Kit des réactifs de la PCR) et détection par fluorescence.

3.4.3. Expression des résultats

Les tubes préparés pour les trois pathogènes sont placés dans le thermocycleur du système BAX[®] et le programme d'amplification est lancé. Les résultats sont exprimés selon la présence ou l'absence des pathogènes (négative ou positive).

4. Caractérisation microscopique de la peau de chèvre

4.1. Mode de prélèvement des échantillons

A l'aide d'une lame stérile, nous avons découpé deux morceaux d'une surface de 1cm² à partir du cou et de membre antérieur de chaque sac (Figure 11 a et b) avant contact avec le *lben* (PF1, PF2, PS1, PS2) mais après contact avec le *lben*, nous avons découpé un morceau de 2cm² situé dans la partie centrale (Figure 11c) de chaque sac (PF1Lb, PF2Lb, PS1Lb, PS2Lb) qui va être découpé ultérieurement en deux morceaux de 1cm².

Un morceau servira à l'observer en microscope électronique à balayage (MEB) et l'autre au microscope confocal à balayage laser (MCBL).



Figure 11. Images représentatives de mode de prélèvement des échantillons de peau pour l'observation microscopiques

4.2. Analyse par le microscope électronique à balayage (MEB).

L'observation microscopique des échantillons de peau de chèvre à l'aide du **microscope électronique à balayage (MEB)** permet la caractérisation qualitative et quantitative de la microstructure de la peau de chèvre avant et après contact avec *lben*.

Deux échantillons de chaque peau de chèvre (un avant et un après contact avec *lben*) ont été analysés avec un microscope électronique à balayage Jeol JSM 590 0LV (Jeol, Tokyo, Japan) fonctionnant à une tension d'accélération de 15 kilovolts, d'une distance de 8-37mm et d'un rapport optique de 60-200-1000-2000 -X5000- X10000 à fin d'obtenir une représentation significative de la microstructure de la peau de chèvre.

4.2.1. Préparation des échantillons

Après prélèvement, les échantillons de peau de chèvre ont été mis dans une série de solutions d'éthanol à gradient de concentration (75, 85, 95 et 100%) et à une température ambiante pendant 12 heures pour chaque degré de concentration. Ils ont été séchés par la méthode de point critique dans le CO₂ en remplaçant l'éthanol avec le CO₂ liquide qu'on peut pratiquer son élimination à son point critique (31.1°C, 72.9 atmosphère) en utilisant le Polaron CPD 7501 (Polaron, Watford, UK). La pression et la température sont progressivement élevées jusqu'à ce que la solution soit supercritique et le CO₂ liquide se transforme en gaz sans endommager les tissus. Les échantillons ont été maintenus dans un dessiccateur, puis enrobés par pulvérisation de la poudre métallique (or- palladium) dans le but de faciliter la conduction des électrons lors de l'observation avec MEB.

4.2.2. Observation

La surface entière de chaque échantillon a été analysée par MEB, et les images prises à X60 et X200 ont été analysées quantitativement en utilisant un logiciel d'image équipé avec l'analyse des pores. La porosité de la peau, la surface moyenne des pores, diamètres minimum(D_{\min}) et maximum(D_{\max}) des pores de la peau ont été calculés.

4.3. Analyse par le microscope confocal à balayage laser (MCBL)

L'analyse des échantillons de peau de chèvre avec le **Microscope confocal à balayage laser (MCBL)** permet d'étudier la viabilité et la répartition des cellules bactériennes sur le biofilm de la peau.

Les échantillons de peaux ont été analysés avec un microscope confocal spectral NIKON C1-Si TE2000E inversé et motorisé (Champigny- sur -Marne, France).

4.3.1. Préparation des échantillons

4.3.1.1. Préparations des sondes fluorescentes

Le BACLIGHT (Live/Dead) et le CONCANAVALIN ALEXA FLUOR 633 sont les deux sondes fluorescentes utilisées pour le marquage des bactéries. Le BACLIGHT (Live/Dead) est constitué de *syto9* et de *Propidium iodide*, le premier donne une coloration verte aux cellules vivantes et le deuxième donne une coloration rouge aux cellules mortes. L'idéal est de travailler à l'obscurité et à températures ambiante parce que les colorants sont très sensibles à la lumière.

a. Préparation du BAC LIGHT (live/dead) (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit)

Le contenu d'un tube de *syto9* (Live-deadInvitrogen L13152, Cergy-Pontoise, France) et l'autre de *Propidium Iodide* ont été additionnés chacun à 2,5ml d'eau desionisée, ensuite la quantité nécessaire est utilisée, le reste a été divisé en petites quantités dans les tubes PCR et stocker à -20°C.

b. Préparation du CONCANAVALIN ALEXA FLUOR 633 (Invitrogen 21402)

1mg de Concanavalin Alexa Fluor 633 a été dilué dans 5ml de solution NaHCO_3 . La solution de NaHCO_3 est préparée par ajout de 0,042g de NaHCO_3 dans 5ml d' H_2O . La solution est divisée en petites quantité dans des aliquotes et stockée à -20°C.

4.3.1.2. Coloration des échantillons de peau de chèvre

Les spécimens ont été directement colorés avec les sondes fluorescentes sur les lames de microscope. On met 15 μl de BacLignt LIVE/DEAD kit de viabilité bactérienne sur la peau et on l'incube à l'obscurité pendant 15 minutes. Ensuite on met 15 μl du Concanavalin

Alexa Fluor 633 1% à 0,1M NaHCO₃ et on le laisse reposer 15 minutes. Après chaque coloration on rince la peau à l'obscurité.

4.3.2. Observation

Les images ont été prises à un grossissement de X60. Une barre de dimension est utilisée pour identifier la cellule bactérienne. L'échantillon de la peau peut se déplacer ce qui rend la mise au point difficile.

Résultats et discussion

1. Caractérisation physicochimique

1.1 Composition physicochimique du lait et *dulben*

La composition physicochimique du lait et *dulben* est représentée dans le tableau suivant

Tableau 8. Composition physicochimique du lait et du *Lben*(g/100ml)

Paramètres	Lait	Lben
pH	6,6 ± 0,00	4,64 ± 0,20
Acidité titrable (°SH)	8,80	35,11± 0,45
Extrait sec total	12,64	10,51 ± 0,12
Matière grasse	4,34	2,80 ± 0,14
Protéines	3,62	3,24 ± 0,10

Le lait cru utilisé dans la préparation *dulben* a une acidité de 8,80°SH qui correspond à 0,19% (0,19g d'acide lactique par 100ml de lait) et un pH de 6,6. Le pH et l'acidité du lait sont acceptables selon les valeurs données par ALAIS. (1984) et AMIOT et *al.* (2002). Sa teneur en extrait sec total, en matière grasse et en protéines entre dans les intervalles donnés MATHIEU (1997) et AMIOT et *al.* (2002).

Le pH et l'acidité du lait dépendent de la teneur en caséine, en sels minéraux et en ions (ALAIS, 1984), des conditions hygiéniques lors de la traite, de la flore microbienne totale et de son activité métabolique (MATHIEU, 1997).

Le pH et l'acidité *dulben* reflètent la fermentation spontanée du lait. Sa teneur en extrait sec total est de 10,51%. Cette moyenne est légèrement supérieure aux résultats obtenus par AISSAOUI ZITOUN. (2004) 9,02% et BENMESSAI et FATHALLAH. (2009) 8%.

Sa teneur en matière grasse varie en fonction de l'intensité de l'écémage. Elle présente une valeur de 28g/l, cette valeur est supérieure à celle trouvée par AISSAOUI ZITOUN.(2004) 9,14%. Selon SAMET-BALI et *al.*(2010), le *lben* traditionneltunisien présente un teneur en matière grasse de 3,50 g/l.la teneur en protéine *dulben* présente une valeur de (3,24%)

1.2. Évolution de pH et de la température du lait au cours de la fermentation

Le suivi du changement de pH et de la température du lait cru de vache durant l'acidification spontanée pour la fabrication *dulben* est déroulé à l'aide de deux pH mètres thermomètres portatifs. Les valeurs enregistrées (annexe 3) par ces derniers ont été exprimées en (figure 12).

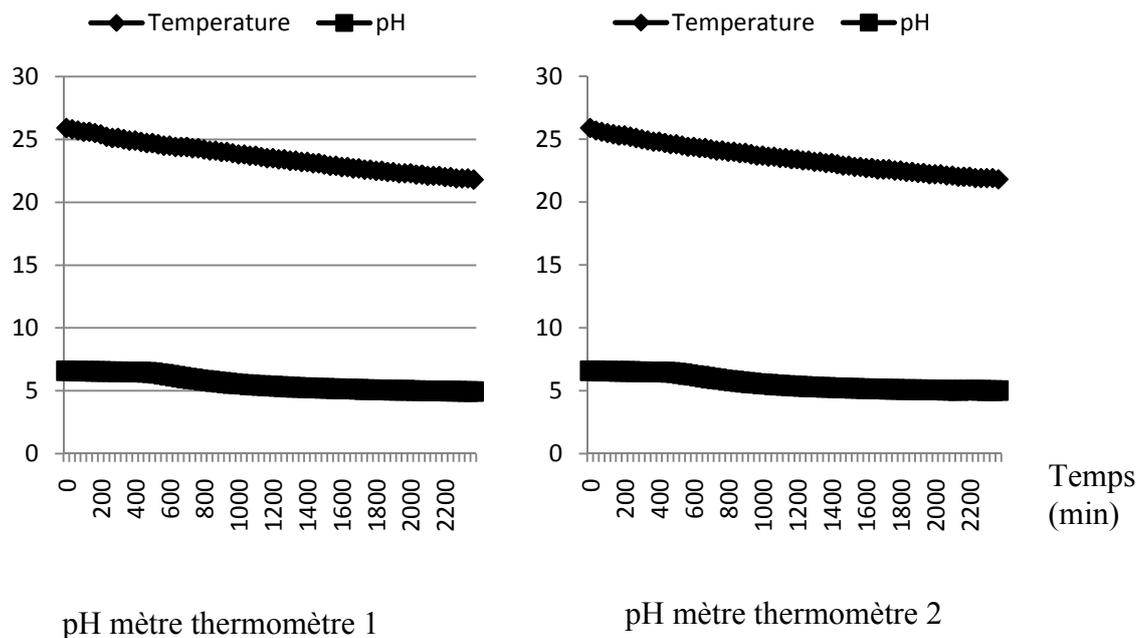


Figure 12. Courbes représentatives de l'évolution de la température et de pH en fonction de la durée de fermentation (24h).

Le pH passe de 6,59 à 4,94 dans le premier digramme et de 6,58 et 5,01 dans le deuxième après 24 heures de fermentation. La chute de pH est due à la consommation de lactose par la flore lactique indigène de lait. En parallèle, La température évolue entre 25,9 et 21,8°C.

1.3. Evolution de pH et de l'acidité titrable *dulben* durant son séjour dans les *chekouates*.

L'évolution de pH et de l'acidité titrable *dulben* au cours de son contact avec les peaux fraîches et sèches ont été exprimés en (figure 13)

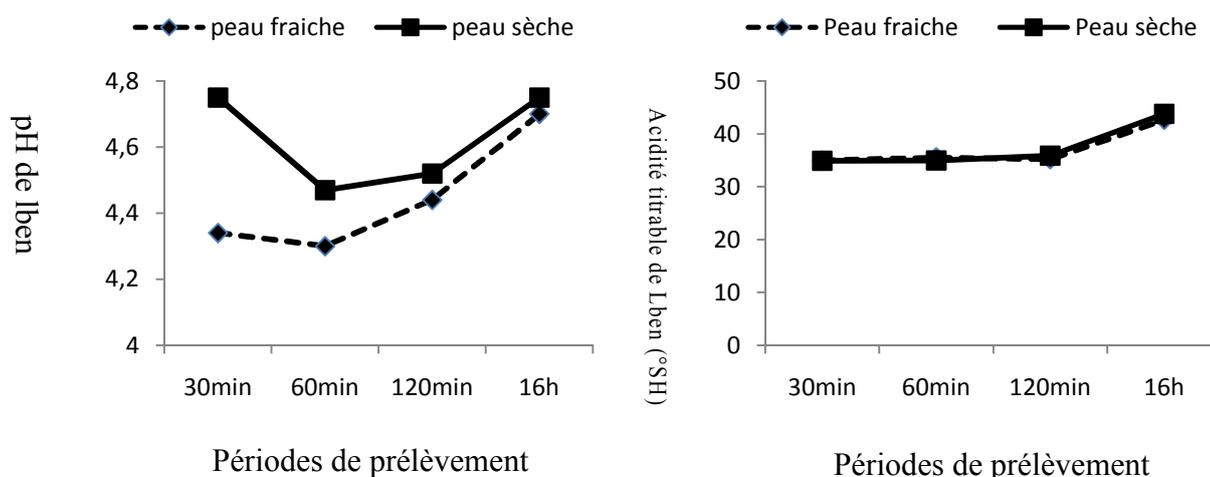


Figure 13. Évolution de pH et de l'acidité titrable de *lben* durant son séjour dans les

A l'intérieur des *chekoutes*, l'évolution de pH *dulben* au cours de son séjour dans la peau fraîche et sèche (figure 13) montre une baisse de pH entre 30 et 60min avec un minimum de 4,30 dans la peau fraîche et 4,47 dans la peau sèche. Une augmentation de pH a été notée entre 1h et 16h dans les peaux fraîche et sèches. Elle est peu être expliquée d'une part par la dégradation d'acide (développement des levures et des moisissures au détriment de la flore lactique) et/ ou par la solubilisation de l'acide lactique dans le lactosérum qui sort à travers les perforations des peaux. Les résultats détaillés sont représentés en (annexe 4)

L'évolution de l'acidité titrable (°SH) *dulben* au cours de son séjour dans les peaux fraîches et sèches(figure 13) présente la même allure. Elle est caractérisée par une augmentation au cours de temps pour atteindre des valeurs maximales après 16h. Ces valeurs varient de 34,9 à 42,63°SH dans les peaux fraîches et de 34,8°SH à 43, 8°SH dans les peaux sèches. De ce fait nous relevons que ces variations sont imputables au développement des bactéries lactiques qui acidifient le milieu par la production d'acide lactique. Les résultats détaillés sont représentés en (annexe 5).

2. Caractéristiques microbiologiques

2.1. Caractéristiques microbiologiques du lait et *dulben*.

Le lait et le *lben* préparé pour le rinçage des *chekoutes* présentent les caractéristiques microbiologiques suivantes (tableau 9)

Tableau 9 .Caractéristiques microbiologiques du lait et *dulben*(UFC/ml)

Microorganismes recherchés (Unité Formant Colonie/ml)	Lait	<i>Lben</i>
Flore totale aérobie mésophile (FTAM)	1,1 10 ⁷	1,6 10 ⁸
Flore lactique		
Lactobacilles	7,9 10 ⁵	2,1 10 ⁷
Lactocoques	1,4 10 ⁷	1,7 10 ⁸
Flore fongique		
Levures	8,0 10 ²	4,0 10 ⁵
Moisissures	□10	1,1 10 ⁴
Entérobactéries	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence

La flore totale aérobie mésophile (FTAM) dans le lait de vache est de 1,1 10⁷UFC/ml. Et elle passe dans le *lben* préparé à 1,6 10⁸ UFC/ml. Le *lben* est issu d'un lait qui a été le

siège d'une prolifération microbienne non contrôlée. Selon MONTEL *et al.* (2002), le contrôle microbiologique du lait débute dans les environnements de ferme. A chaque ferme sont associés des pratiques de production du lait, des conditions de traite, des pratiques de nettoyage différentes, qui jouent un rôle majeur dans la constitution des communautés microbiennes dans ce dernier.

La charge en lactobacilles du lait est de $7,9 \times 10^5$ et elle passe à $2,1 \times 10^7$ UFC/ml dans le *lben*. Le lait constitue l'habitat de la majorité des lactobacilles (BERNARDEAU *et al.*, 2008). AISSAOUI ZITOUN et ZIDOUNE (2006) ont signalé une charge de $2,4 \times 10^7$ UFC/ml de lactobacilles dans le *lben* qui est tout à fait différente de celle de HARRATI (1974) qui a remarqué l'absence de cette flore dans le *lben* Algérien et qu'elle l'explique par la présence de facteurs inhibiteurs pour les lactobacilles (TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983).

Le dénombrement de lactocoques dans le lait et le *lben* a permis de constater que la charge des lactocoques est plus importante que celle des lactobacilles (Tableau 9). Plusieurs auteurs ont rapporté que le lait constitue un habitat privilégié des lactocoques (DELLAGLIO *et al.* (1994); CORROLER *et al.* (1999)). Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), le *lben* artisanale présente une charge en lactocoques de l'ordre de 10^8 UFC/ml qui est proche à notre résultat (Tableau 9). La prédominance des bactéries lactiques a été rapportée dans le *lben* marocain (BENKERROUM et TAMINE, 2004), tunisien (SAMET-BALI *et al.*, 2010) et Algérien (AISSAOUI ZITOUN *et al.*, 2011a).

Dans le lait et le *lben*, la charge de levures est plus importante que celles des moisissures (moins de 10 UFC/ml dans le lait et $1,1 \times 10^4$ UFC/ml dans le *lben*). En général, les moisissures se retrouvent fréquemment dans les laits, mais leurs niveau moyen ne dépasse pas 10 UFC/ml (MICHEL *et al.*, 2001; TORKAR et VENGUST, 2008).

Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012), le *lben* présente une charge en flore fongique de $6,1 \times 10^6$ UFC/ml qui est légèrement supérieur à notre résultat $4,1 \times 10^5$ UFC/mL. Le *lben* présente une augmentation de la charge en levures et en moisissures en comparaison avec le lait, cela peut être due à l'effet favorable de l'acidité développée dans le produit. Selon BENKERROUM et TAMIME (2004), la charge de levures dans le *lben* marocain est inférieure à celle des bactéries lactiques. La même chose est constatée dans notre *lben*.

Les échantillons du lait et le *lben* ont été caractérisés par l'absence des entérobactéries (Tableau 9). Ces résultats sont largement mineurs par comparaison avec les résultats d'AISSAOUI ZITOUN (2004) qui a trouvé une charge assez importante (30×10^5 CFU/ml) dans le *lben*.

Le test coagulase a été signalé négatif dans les échantillons du lait et *lben*. Ce résultat a permis de confirmer l'absence de *S.aureus* dans ces derniers. L'absence de *Staphylococcus aureus* dans les échantillons *dulben* peut être expliquée par l'acidité de milieu ($\text{pH} < 5$) qui inhibe fortement sa croissance (CHARLIER *et al.*, 2008).

2.2. Caractéristiques microbiologique de la peau de chèvre avant contact avec *lben*

Les peaux de chèvre préparées et analysées avant contact avec *lben* représentent les caractéristiques microbiologiques suivantes (Tableau 10)

Tableau 10. Caractéristiques microbiologiques des peaux fraîches et sèches analysées avant contact avec *lben* (UFC/300cm²)

Microorganismes recherchés	Peaux fraîches	Peaux sèches
FTAM	$7,2 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^3$
Lactobacilles	$3,4 \cdot 10^2$	Absence
Lactocoques	$9,7 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^3$
Levures	Absence	Absence
Moisissures	Absence	Absence
Entérobactéries	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence

Le biofilm des peaux de chèvre analysé avant contact avec *lben* présente une faible charge microbienne se situant entre 10^2 et 10^3 UFC/300cm² (Tableau 10). La charge en FTAM et en lactocoques dans le biofilm des sacs de peaux fraîches est plus faible que celle des sacs de peaux sèches (Tableau 10). Dans les peaux sèches, les lactobacilles sont absentes cela peut être probablement expliqué par l'effet inhibiteur de séchage et de salage. Cependant leur charge dans les peaux fraîches est de l'ordre de $3,4 \cdot 10^2$ UFC/300cm², ce résultat est inférieur à celui trouvé par AISSAOUI ZITOUN (Thèse en cours) (10^3 - 10^5 UFC/cm²).

Le biofilm des différents sacs de peau de chèvre (fraîche et sèche) analysés avant contact avec *lben* est caractérisé par l'absence de levures, de moisissures, d'entérobactéries et de *Staphylococcus aureus*. Selon les résultats d'AISSAOUI ZITOUN (Thèse en cours), le biofilm des deux peaux de chèvre fraîches a été caractérisé par l'absence de levures et de moisissures et de *S.aureus* ce qui confirme notre résultat mais la numération des entérobactéries a été relativement importante (10^5 - 10^6 UFC /cm²).

2.3. Caractéristiques microbiologiques de la peau de chèvre après contact avec *lben*

Les peaux de chèvre analysées après une nuit (16h) de contact avec *lben* et rinçage avec l'eau comme décrit le diagramme artisanal de préparation de la *chekou* présentent les caractéristiques microbiologiques suivantes (Tableau 11)

Tableau 11. Caractéristiques microbiologiques de la peau de chèvre après une nuit de contact avec *lben* (UFC/300cm²)

Microorganismes recherchés	Biofilm des peaux fraîches	Biofilm des peaux sèches
FTAM	1,1 10 ⁶	1,2 10 ⁶
Lactobacilles	5,2 10 ⁵	9,3 10 ⁵
Lactocoques	6,8 10 ⁵	1,2 10 ⁶
Levures	8,9 10 ²	6,2 10 ²
Moisissures	Absence	Absence
Entérobactéries	Absence	Absence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Absence	Absence

Le biofilm de la peau de chèvre (fraîche et sèche) analysé après contact avec *lben* montre une élévation de la charge microbienne totale (environ 10⁶ UFC/300cm²). Le nombre en lactobacille et en lactocoques devient beaucoup plus élevé en comparaison avec celui des peaux de chèvre analysées avant contact avec *lben* (tableau 11). D'autre part et après 16h de contact avec *lben*, l'apparition des levures a été remarquée dans les peaux fraîches et sèches.

La peau analysée après contact avec *lben* a été caractérisée par l'absence de moisissures, d'entérobactéries et de *Staphylococcus aureus*.

2.4. Caractéristiques microbiologiques *dulben* au cours de son séjour dans les peaux fraîches et sèches

L'évolution des différentes flores microbiennes *dulben* au cours de son séjour dans les peaux fraîches et les peaux sèches est présentée dans la figure 14.

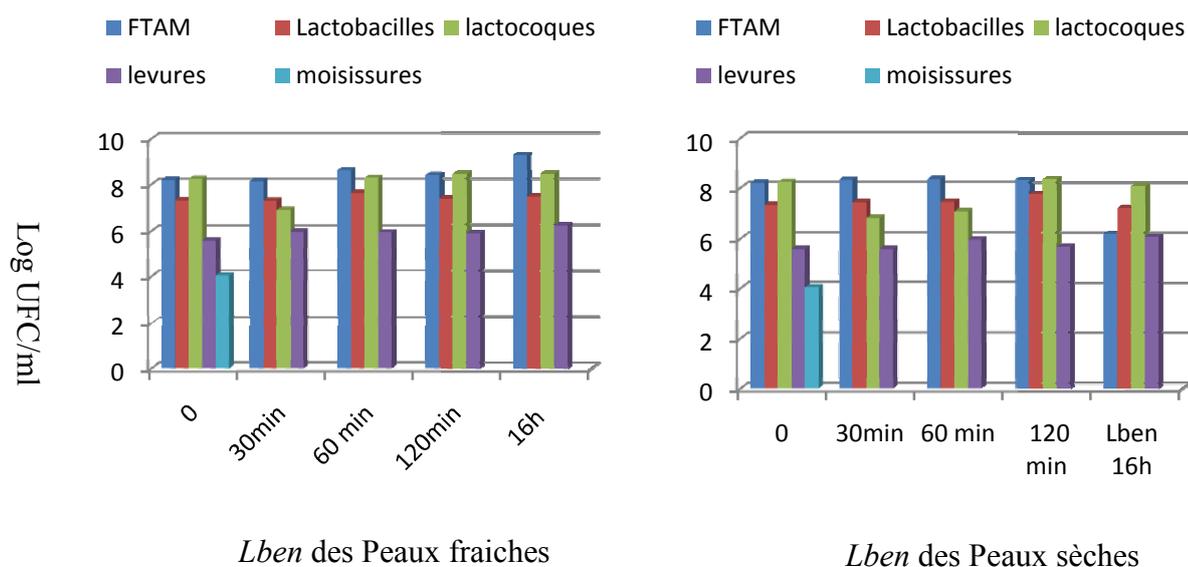


Figure 14. Évolution de la flore totale aérobie mésophile, Lactobacilles, lactocoques, levures, moisissures dans les échantillons de lben au cours de son séjour dans les peaux fraîches et sèches

Les échantillons de *lben* prélevés après 30, 60, 120min et 16h à partir des peaux fraîches et sèches ont montrés une augmentation presque similaire de la FTAM au cours du temps, seulement dans les peaux sèches la charge a diminuée à 10^6 UFC/ml après 16h de contact (figure 14).

Dans l'ensemble des échantillons de *lben* des différentes peaux, la charge en lactobacilles est de l'ordre de 10^7 UFC/ml. Cependant une évolution progressive de lactococques a été notée variant de 10^6 à 10^8 UFC/ml. Les résultats détaillés sont représentés en (annexe 6).

Une évolution régulière de la charge en levures a été constatée dans les échantillons de *lben* prélevés à partir des peaux fraîches et sèches avec une variation de 10^5 à 10^6 UFC/ml. Elle est peut être expliquée d'une part par le développement de l'acidité au cours du temps et d'autre part par l'aération du produit à travers les pores des peaux qui activent leur croissance.

Tous les échantillons de *lben* ont été caractérisés par l'absence de moisissures, d'entérobactéries et de *Staphylococcus aureus*.

3. Identification de l'écosystème par PCR-TTGE (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*)

3.1. Écosystème microbien du lait et du *lben* préparé

Le profil TTGE du lait et du *lben* préparé est représenté dans la figure 15

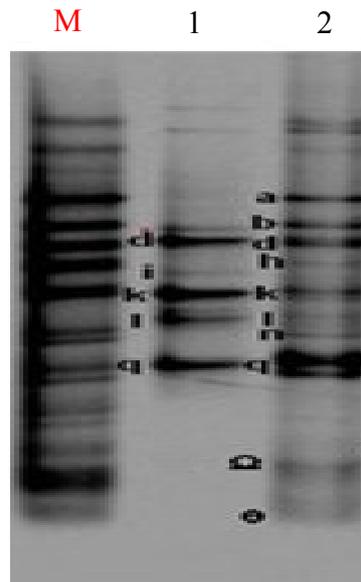


Figure15. Identification par PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites de lait (1) et de *lben* (2) préparé.

M. ADN génomique Marqueur, 1. Lait, 2. *Lben*

La PCR-TTGE a montré que trois espèces dominant dans le lait cru utilisé dans la fabrication du *lben*. Ce sont *Staphylococcus equorum* subsp. *plinius* (d), *Enterococcus faecalis* (k), *Streptococcus thermophilus* (q) (figure15), et elles ont été aussi détectées dans le *lben*.

Nous avons noté que des nouvelles espèces ont été apparues dans le *lben*, ces espèces sont : *Lb. plantarum* (a), *Lb. fermentum* (b), *Lb. Helveticus* (h), *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* (l), *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* (n), *Corynebacterium casei* (Ω), *Propionibacterium freudenrichii* (θ).

Le *lben* marocain est caractérisé par la dominance de *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Les *Lactobacillus* spp, sont aussi présents. Les espèces dominantes sont *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis* et subsp. *Lactis biovardiacetylactis*, et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* et subsp. *lactis* (TANTAOUI-ELARAKI *et al.*, 1983)

Selon les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b), le lait cru a révélé la dominance de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* dans le lait et dans le *lben*.

3.2. Écosystème microbien des peaux de chèvre avant et après contact avec *lben*

Le profil TTGE des différents échantillons de peau de chèvre analysés avant (PF1, PF2, PS1, PS2) et après contact avec *lben* (PF1Lb, PF2Lb, PS1Lb, PS2Lb) est représenté dans la figure 16

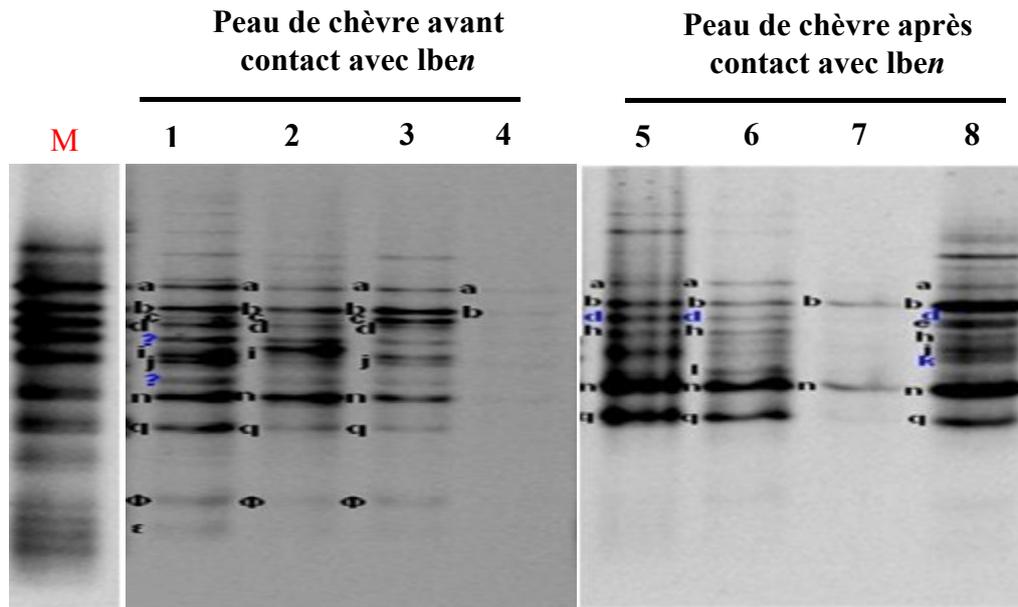


Figure 16. Identification par PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites de biofilm des quatre *chekouates* analysées avant et après contact avec *lben*.

M. ADN génomique marqueur ; **1.** Peau fraîche 1 (PF1) ; **2.** Peau fraîche 2 (PF2) ; **3.** Peau sèche 1 (PS1) ; **4.** Peau sèche 2 (PS2) ; **5.** PF1Lb ; **6.** PF2Lb ; **7.** PS1Lb ; **8.** PS2

Les résultats du profil TTGE ont montré que les biofilms des deux peaux de chèvre fraîches (PF1, PF2) prélevés avant contact avec *lben* sont riches en micro-organismes, avec la détection de 12 bandes dans PF1 (figure 16) : *Lactobacillus plantarum* (a), *Lb. fermentum* (b), *Leuconostoccremoris/Ln. mesenteroides* (c), *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* (d), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (i), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (j), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (n), *S. thermophilus* (q), *Lb. paracasei/Lb. casei/ Lb rhamnosus/Lb. zaeae/ Bifidobacterium infantis* (Φ), *Brevibacterium. casei* (ε) en plus de deux bandes inconnues) et huit bandes dans PF2 (*Lactobacillus plantarum* (a), *Lb. fermentum* (b), *Leuconostoccremoris/Ln. mesenteroides* (c), *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* (d), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (i), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (n), *S. thermophilus* (q), *Lb. paracasei/ Lb. casei/ Lb rhamnosus/ Lb. zaeae/ Bifidobacterium infantis* (Φ) avec la présence de bandes communes entre les biofilms des deux peaux de chèvre (a-b-c-d-i-n-q-Φ)

En comparaison avec les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b), nous retrouvons cinq bandes communes correspondant aux espèces suivantes : *Lb. plantarum/Lb.*

johnsonni/ *Lb.gasseri*(a), *Lb. fermentum* (b), *Staphylococcus equorum*subsp.*linens*, *Streptococcus thermophilus* et *Lb.paracasei*/ *Lb. casei*/ *Lb rhamnosus*/ *Lb.zaeae*/ *B.infantis* (Φ).

AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b) ont détecté 10 à 13 bandes dans les peaux de chèvres. Par ailleurs les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.*(2012) sur le fromage *Bouhezza* au lait de vache à 70 j d'âge confirme la dominance de *Lactobacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*. Ces dernières ont été présents dans le biofilm de peaux fraîches et sèches. Aussi SAOUDI (2012) a signalé que le fromage *bouhezza* est caractérisé par la présence majoritaire de *Lactobacillus plantarum* et *delactococcus lactis* subsp *cremoris*

Les lactobacilles sont importants pour la flaveur des fromages (KANAWJIA *et al.*, 1996; BERESFORD *et al.*, 2001; WOUTERS *et al.*, 2002; KIERONEZYK *et al.*, 2003). *Lactobacillus plantarum* est considérée comme étant le principal lactobacille qui caractérise l'environnement laitier. Il prédomine dans plusieurs fromages comme l'*Ibore* (MAS *et al.*, 2002) et le *Nostrano dii primiero* (POZNANSKI *et al.*, 2004).

Selon SERHAN *et al.* (2009), l'écosystème bactérien du fromage *Darfiyah* affiné dans la peau de chèvre est constitué des espèces suivantes: *Lb. plantarum*, *Lc lactis* subsp. *lactis* et *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus curvatus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus fascium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus Malodoratus*.

Lactococcus lactis subsp *lactis*; *Lc lactis* subsp *cremoris* sont les sous espèces du genre *Lactococcus* les plus fréquemment connues par leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (LAFARAGE *et al.*, 2004) et pour l'implication dans la formation du goût et de l'arôme (CORROLER *et al.*, 1999)

Dans les peaux sèches, le comportement suite au séchage et salage semble être variable d'une peau à l'autre. Quatre bandes (*Lactobacillus delbrueckii*subsp *bulgaricus* (i) *Brevibacterium. casei*(ε) et deux bandes inconnues) n'ont pas été détectés dans PS1 (figure 16), et presque la totalité des bandes dans PS2 à l'exception de deux (a-b).

Des bandes correspondantes aux bactéries à haut pourcentage G+C ont été apparues: *Lactobacillus paracasei* (Φ); *Brevibacterium. casei* (ε). *Corynebacterium casei* (Ω); *Propionibacterium microaerophilum* (β) et *Propionibacterium freuderechii* (θ). Les deux premières espèces ont été apparues dans le biofilm de PF1 (figure 16).

AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b) ont constaté que le profil TTGE du biofilm de la peau fraîche a confirmé la présence de bactéries de haut pourcentage GC: *Bifidobacterium longum*, *Arthrobacter nicotianae*, *Propionibacterium microaerophilum*, *Bacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei* et *Corynebacterium flavescens* ce qui permet la mise en évidence du

fait que le biofilm de la peau de chèvre n'est pas exclusivement composé de bactéries lactiques mais qu'il présente une composition très variable.

La variabilité de l'écosystème microbien de la peau de chèvre était en accord avec les résultats trouvés par LICITRA *et al.* (2007) qui ont rapporté que le profil TTGE des cinq biofilms de tina (cuve en bois utilisée dans la fabrication du fromage *Ragusano*) provenant de cinq fermes différentes a confirmé la dominance des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* et *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis*) avec la présence de quelques espèces bactériennes de haut pourcentage GC comme les bactéries corynéformes.

3.3. Ecosystème microbien *lben* au cours de son séjour dans les *Chekouates*

Le résultat de la PCR-TTGE des différents échantillons de *lben* prélevés à partir des quatre *chekouates* à différents temps (30, 60, 120min et 16h) est représenté dans la figure 17

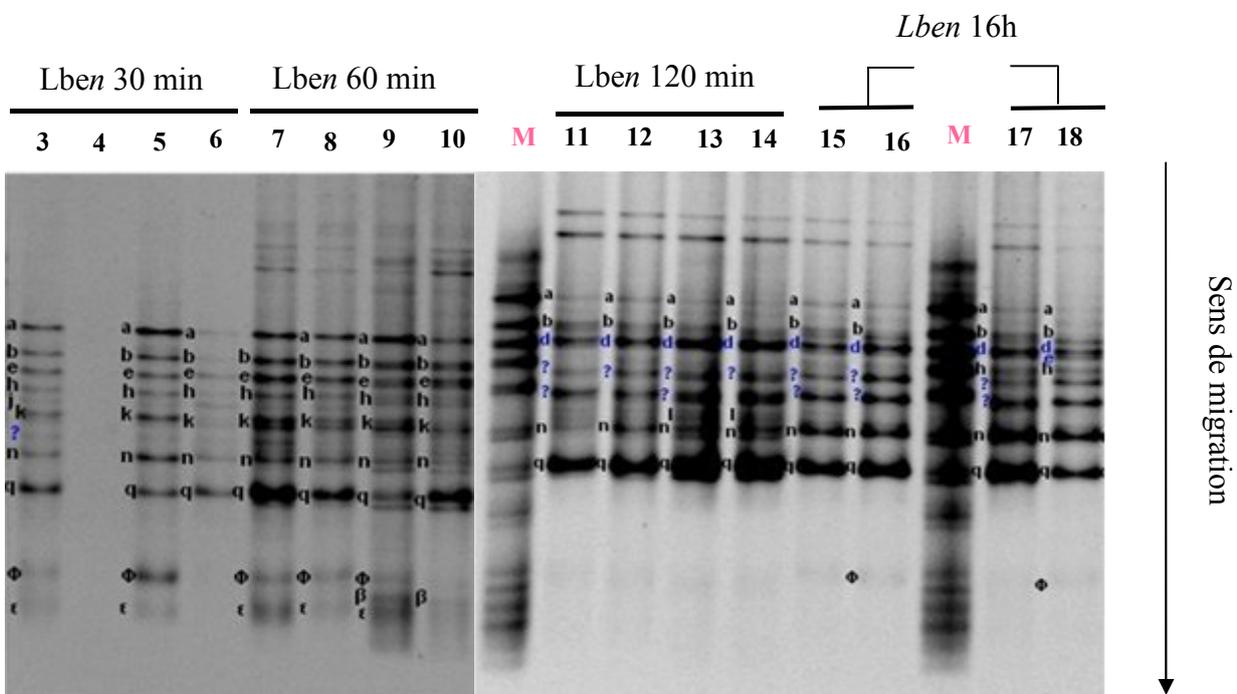


Figure 17 . Identification par la PCR-TTGE des fragments de la région V3 de l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S des bactéries extraites des échantillons de *lben* prélevés après 30,60, 120 min et 16h de contact avec les quatre *chekouates*

M. ADN génomique marqueur ;**3.***Lben* après 30 min dans PF1 ; **4.***Lben* après 30 min dans PF2 ; **5.** *Lben* après 30 min dans PS1; **6.** *Lben* après 30 min dans PS2 ; **7.** *Lben* après 60 min dans PF1 ; **8.** *Lben* après 60 min dans PF2 ; **9.***Lben* après 60 min dans PS1 ; **10.** *Lben* après 60 min dans PS2 ;**11.** *Lben* après 120 min dans PF1 ; **12.** *Lben* après 120 min dans PF2 ; **13.***lben* après 120 min dans PS1 ;**14.***Lben* après 120 min dans PS2 ;**15.** *Lben* après 16h dans PF1 ;**16.** *Lben* après 16h dans PF2 ; **17.***Lben* après 16h dans PS1 ;**18.** *Lben* après 16h dans PS2.

Comme dans le procédé traditionnel de fabrication du fromage *Bouhezza*, le *lben* est laissé une nuit dans la *Chekoua*. Les échantillons *dulben* prélevés à différents temps de contact (0, 30, 60, 120 minutes, 16 heures respectivement avec la peau montrent une dominance de quatre espèces (Figure 17) : *Lb. Plantarum* (a), *Lb. fermentum*(b), *lactococcuslactis* subsp. *cremoris* (n), *S. thermophilus*(q).

Les échantillons *dulben* prélevés après 30, 60minutes de contact ont présenté un écosystème microbien similaire avec la détection de neuf bandes communes (Figure .17) : *Lb. plantarum* (a), *Lb. fermentum* (b), *EnterococcusFaecium*(e), *Lb. helveticus* (h), *Enterococcusfaecalis*(k), *Lactococcuslactis*subsp .*cremoris* (n), *Streptococcus thermophilus* (q), *Lb.paracasei* (Φ), *Brevibacterium. casei* (ε), les bandes correspondantes à (e-h-k) ont été disparues dans les échantillons *dulben* prélevés après 120 minutes, et après 16 heures de contact (Figure 17) cela peut être probablement du à l'évolution progressif de l'acidité *dulben* en fonction du temps, au phénomène d'adsorption et aussi au possibilité de la sortie des microorganismes à travers les pores.

Selon AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b), les échantillons *dulben* prélevés à temps 0, 10min et 16h de contact avec *chekoua* montre la dominance de *Lactococcuslactis*subsp. *cremoris* et *Streptococcus gallolyticus*subsp.*macedonicus* et l'apparition de deux bandes qui correspondent à *Lb.delbrueckii*subsp*bulgaricus* et à *Lb.plantarum*. Les bandes correspondantes à *Lb.brevis* et *Staphylococcus equorum*subsp*linens* ont été détectées seulement dans les échantillons *dulben* prélevés après 10min et 16 heures de contact.

3.4. Effet du contact sur l'écosystème microbien de la peau de chèvre et le *lben*

La bande qui correspond à *Lactobacillus helveticus* apparait dans les échantillons de *lben* prélevé à temps 0, 30, 60min de contact (figure 17) et dans le biofilm de la peau de chèvre après une nuit de contact (Figure 16) ce qui permet de deceler l'échange de micro-organismes entre le *lben* et la *chekoua* (un transfert de micro-organismes à partir du *lben* vers la peau de chèvre). Les bandes qui correspondent à *Lb. paracasei*/ *Lb. casei*/ *Lb. zaeae*/*B.infantis* (Φ)et *Brevibacterium. casei* (ε)ont été détectées dans le biofilm de la peau de chèvre avant contact et dans les échantillons de *lben* prélevés après 30, 60min de contact avec la peau ce qui révele probablement un transfert ou bien libération de micro-organismes à partir de la peau de chèvre dans le *lben*.

D'après les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al* (2011b), le profil TTGE après contact avec *Lben* et deux *chekoua* (chaque *chekoua* à part) a montré la présence des *Staphylococcus equorum* subsp. *linens* et de *Lb. brevis* dans *lben* qui étaient absentes avant contact, et aussi le profil de TTGE a montré l'absence de la bande associée à *Lb helveticus*/

Lb acidophilus/Lb. cripatius, dans le *lben* après contact pendant 10min et 16heures, ces derniers sont pourtant présentes au départ dans *Lben* et dans le biofilm de la deuxième *chekoua* ce qui confirme nos résultats qui montrent probablement un effet d'échange entre les micro-organismes de *Lben* et de "Chekoua" et leur résultats sur l'écosystème de *bouhezza*.

Une bande inconnue à faible GC a été apparue dans le profil TTGE de la peau de chèvre (Figure 16) et dans le *lben* après 60 min de contact (Figure 17). AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2012) ont rapporté que *Bouhezza* d'une semaine à trois semaines d'affinage a été caractérisé par la présence de *Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc cremoris/Ln mesenteroides* et d'une bande inconnue à faible GC. Nous pouvons probablement dire que cette dernière peut être libérée à partir la peau de chèvre dans le *lben* et puis dans le fromage *Bouhezza*.

4. Détection des bactéries pathogènes

Les micro-organismes pathogènes du lait et du fromage sont des micro-organismes pour la plupart ubiquitaires qui peuvent être responsable de toxi-infection alimentaires ou d'intoxication. Dans les fromages, les micro-organismes potentiellement pathogènes qui sont soumis à des normes réglementaires sont *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* (ALOMAR, 2007).

Le tableau suivant présente les résultats de détection des trois bactéries pathogènes dans l'échantillon du lait, *dulben* et du biofilm de peau de chèvre avant et après contact avec *lben*

Tableau 12. Présence ou absence des trois bactéries pathogènes dans le lait, *lben* et biofilm de peau de chèvre

Germes Echantillons	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia. coli O157 :H7</i>	<i>Salmonella</i>
<i>UFC/300cm³</i>			
Biofilm de la peau fraîche avant contact avec <i>lben</i>	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)
Biofilm de la peau sèche avant contact avec <i>lben</i>	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)
Biofilm de la peau fraîche après contact avec <i>lben</i>	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)
Biofilm de la peau sèche après contact avec <i>lben</i>	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)

UFC/25ml			
Lait	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)
Lben	Absence (-)	Absence (-)	Absence (-)

Les trois bactéries pathogènes (Tableau12) sont absentes dans le lait, lben et le biofilm de la peau de chèvre fraîche et sèche avant et après contact avec lben.

Listeria monocytogenes est un bacille (0,4 à 0,5µm de diamètre et 0,5 à 2µm de longueur) à Gram positif, non sporulé et non capsulé, anaérobie facultative. Elle est catalase positive et oxydase négative (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). Le nouveau règlement définit que les produits pour lesquels le pH est inférieur à 4,4 ou l'a_w est inférieur à 0,92 et les produits pour lesquels le pH est inférieur à 5 et l'a_w est inférieur à 0,94 sont considérés comme des denrées ne permettant pas le développement de *Listeria monocytogenes* (BELLEFLAMME *et al.*, 2006). En général, les souches de *E. coli* ne tolèrent pas des valeurs basses de pH, mais dans le cas d'*E. coli* O157:H7, elle peut croître à un pH de 4,5 dans les milieux ajustés avec l'HCL, mais ne résiste pas si le pH est ajusté avec l'acide lactique. Elle ne se développe pas dans les fromages à des valeurs de pH égales ou inférieures à 5,4 (FOX *et al.*, 2000).

Selon les résultats d'AISSAOUI ZITOUN *et al.* (2011b), l'analyse par le système BAX[®] de biofilm de surface des deux *Chekouates* préparées par deux peaux de chèvre, avant et après contact avec lben a démontré l'absence des trois pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 et *Salmonella*).

LORTAL *et al.* (2009) a constaté que les agents pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli* O157:H7) sont totalement absentes dans le biofilm de la tina, démontrant l'innocuité de la cuve en bois utilisée dans la fabrication artisanale du fromage *Raguzano*.

Selon les résultats de SAOUDI. (2012), l'analyse par système BAX des six échantillons de *bouhezza* au lait cru de vache : trois échantillons de ferme d'Ain Fakroun et trois autres de ferme d'Ain Kercha a démontré l'absence de bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli* O157:H7). D'après AISSAOUI *et al.* (2012), les trois bactéries pathogènes sont absentes dans deux fabrications *debouhezza* au lait cru de vache pendant 70 jours de maturation et aussi dans quatre échantillons de ferme (Ain Fakroun).

L'écosystème microbien du fromage permet de créer des conditions de milieu inhibant le développement de nombreux micro-organismes indésirables. Les différents facteurs intrinsèques au fromage susceptibles d'agir sur le comportement de *L. monocytogenes* sont le

système lactopéroxydase du lait cru, la présence de certains acides gras (acides laurique, linoléique et linoléique), la production d'acide lactique par les bactéries lactiques, la production de bactériocines (ou d'autres métabolites inhibiteurs) par certaines souches de la flore utile, l'existence de compétitions microbiennes semblent être des éléments favorables à l'inhibition, voire la disparition de la population de *L. monocytogenes* potentiellement présente.

L'absence des trois bactéries pathogènes dans *bouhezza*, fabriqué à partir de lait cru n'ayant subi aucun traitement thermique peut être expliquée par l'effet des conditions physicochimiques de la masse fromagère défavorable à leurs croissances, principalement le pH très faible, et probablement aussi à l'effet des interactions des micro-organismes de l'écosystème créé pendant l'affinage dans la '*Chekoua*', surtout la présence de bactéries lactiques indigènes comme flore majoritaires, qui sont caractérisées par leur énorme potentiel antimicrobien (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

D'après les résultats précédents, l'absence des trois bactéries pathogènes dans les peaux de chèvre avant et après contact avec *lben* peut être expliquée d'une part par le mode de traitement efficace c'est-à-dire l'action inhibitrice de sel et de genièvre à leur multiplication et d'autre part par la dominance des bactéries lactiques dans la peau de chèvre qui pourront avoir une action antimicrobienne.

Du point de vue hygiénique microbien, la *chekoua* pourrait être considérée comme un contenant exempt de bactéries pathogènes.

5. Caractérisation microscopique de la peau de chèvre

5.1. Résultats d'analyse par le microscope électronique à balayage MEB

L'étude de la peau de chèvre avec le MEB permet une analyse quantitative (Forme, dimensions des pores et surface occupée par les pores) et qualitative (morphologie, position et répartition des microorganismes détectés sur la peau) de sa microstructure.

5.1.1. Résultats d'analyse quantitative

Les résultats d'analyse quantitative effectués avec un logiciel intégré au microscope électronique à balayage sont mentionnés sur le tableau suivant :

Tableau 13. Résultats d'analyse quantitative (porosité) des deux peaux de chèvre

Echantillons	Pores
PF1	Impossible de mesurer les dimensions des pores
PS1	Impossible de mesurer les dimensions des pores

PF1Lb	<p>Surface occupée : 3%</p> <p>Forme des pores : elliptique</p> <p>D_{\min} : 41 μm</p> <p>S_m : 1944 μm^2</p>
PS1Lb	<p>Surface occupée : 4%</p> <p>Forme des pores : elliptique et peu écrasée</p> <p>D_{\max} : 79 μm</p> <p>D_{\min} : 34 μm</p> <p>S_m : 1518 μm^2</p>
PF2	<p>Surface occupée : 5%</p> <p>D_{\max} : 132 μm</p> <p>D_{\min} : 64 μm</p> <p>S_m : 3026 μm^2</p>
PS2	<p>Surface occupée : 11%</p> <p>Forme des pores : ovale</p> <p>D_{\max} : 114 μm</p> <p>D_{\min} : 69 μm</p> <p>S_m : 4250 μm^2</p>
PF2Lb	<p>Surface occupée : 4%</p> <p>Forme des pores : elliptique mais ils sont plus long et plus étroits.</p> <p>D_{\max} : 140 μm</p> <p>D_{\min} : 50 μm</p> <p>S_m : 2703 μm^2</p>
PS2Lb	<p>Surface occupée : 4%</p> <p>Forme des pores : elliptique</p> <p>D_{\max} : 121 μm</p> <p>D_{\min} : 52 μm</p> <p>S_m : 3377 μm^2</p>

D'après le tableau 13, le diamètre des pores des peaux fraîches varie entre 41 et 140µm alors que celui des pores des peaux sèches varie entre 34 et 121 µm.

La surface occupée par les pores diminue après une nuit de contact avec *lben* dans les peaux fraîches et sèches cela peut être expliqué par la précipitation des granules de caséines sur celle-ci.

Les follicules pileux de la peau fraîche (PF1) et sèche (PS1) sont occupés de poils la raison pour laquelle il n'était pas possible d'effectuer une analyse quantitative de la microstructure de PF1 et de PS1

5.1.1.1. Microstructure de la peau de chèvre avant contact avec *lben*

L'observation microscopique de peau fraîche et sèche a montré une surface ridée caractérisée par des plis cutanés (figure 18 et 19).

Selon AISSAOUI ZITOUN. (thèse en cours), l'observation microscopique de peau fraîche a révélée une structure fibreuse caractérisée par des plis cutanés ressemblables à nos résultats.

Les deux échantillons de peau fraîche ont présenté deux aspects différents: PF1 a une surface plus ridée que PF2 (figure 18). Les follicules pileux sont occupés de poils dans PF1 contrairement aux follicules pileux de PF2 qui sont vides c'est la raison pour laquelle il n'était pas possible d'effectuer une analyse quantitative de la microstructure des pores qui sont normalement créés après l'extraction de poils. Les mêmes différences ont été observées en comparant PS1 et PS2 (figure 19). La présence de poils peut être probablement due au mauvais dépilage.

La peau fraîche représente des fibres épaisses bien distinctes contrairement à la peau sèche qui montre des fibres presque fusionnées (figure 20). PF2 présente la porosité la plus faible et les pores sont plus petits que dans PS2 (tableau 13).

5.1.1.2. Effet de *lben* sur la microstructure de la peau de chèvre

Les peaux fraîches et sèches après contact avec *lben* ont montré des follicules pileux ouverts dépourvus de poils, ce qui permet de révéler le rôle intéressant de *lben* dans l'arrachage de poils. Dans ce cas, il est possible de mesurer les dimensions des pores.

La peau sèche après contact avec *lben* semble moins serrée et plus molle que la peau sèche avant contact.

Après contact avec *lben*, la porosité de la peau diminue et les pores deviennent plus petits et moins nombreux cela peut être expliqué par la précipitation des granules de caséines piégées dans le tissu épidermique sous forme de caillot volumineux. Cet effet a été observé (figure 21)

La microstructure fibreuse est clairement visible dans les peaux fraîches et sèches avant contact avec *lben* mais après contact avec *lben*, la surface des peaux devient partiellement ou presque entièrement recouverte avec un réseau de granules de caséines représentant le *lben* laissé sur la surface de la peau (figure 21).

5.1.1.3. Comparaison entre la peau fraîche et sèche.

Les peaux fraîches et sèches présentent une surface ridée avec des plis cutanés.

Dans la peau fraîche (figure 18), les plis cutanés sont nombreux et plus profonds que dans la peau sèche (figure 19). Cette dernière apparaît plus serrée que la peau fraîche cela peut être due à l'effet de séchage et de salage qui favorise la perte d'eau ce qui se traduit par l'apparition des fibres presque fusionnés.

Dans PF2 et PS2, nous constatons l'augmentation des dimensions et du nombre des pores dans la peau sèche (PS2) en comparaison avec la peau fraîche PF2. Nous pouvons dire que la porosité augmente dans la peau sèche.

Remarque : il n'était pas possible d'effectuer une analyse quantitative de la microstructure de PF1 et PS1 seulement une évaluation qualitative.

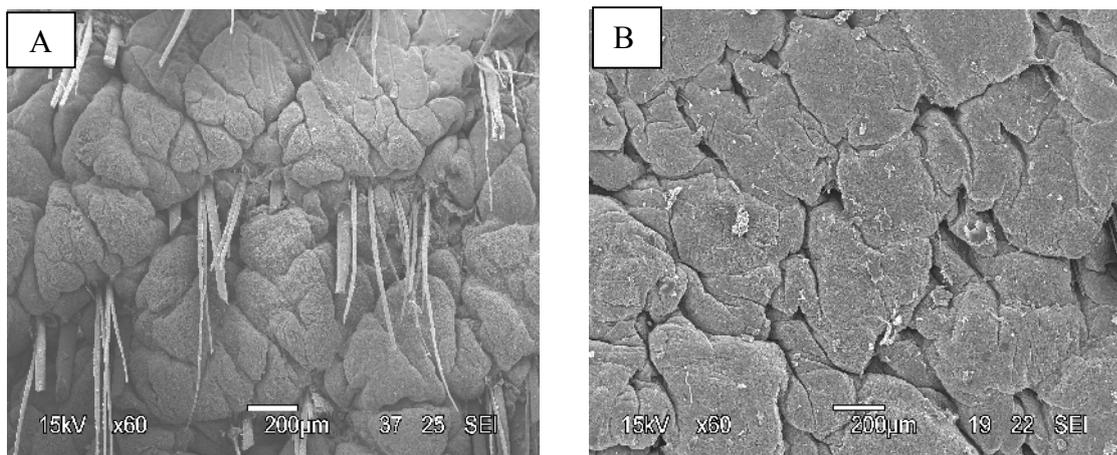


Figure 18. Photos montrant la microstructure de la peau fraîche A) PF1 ; B) PF2

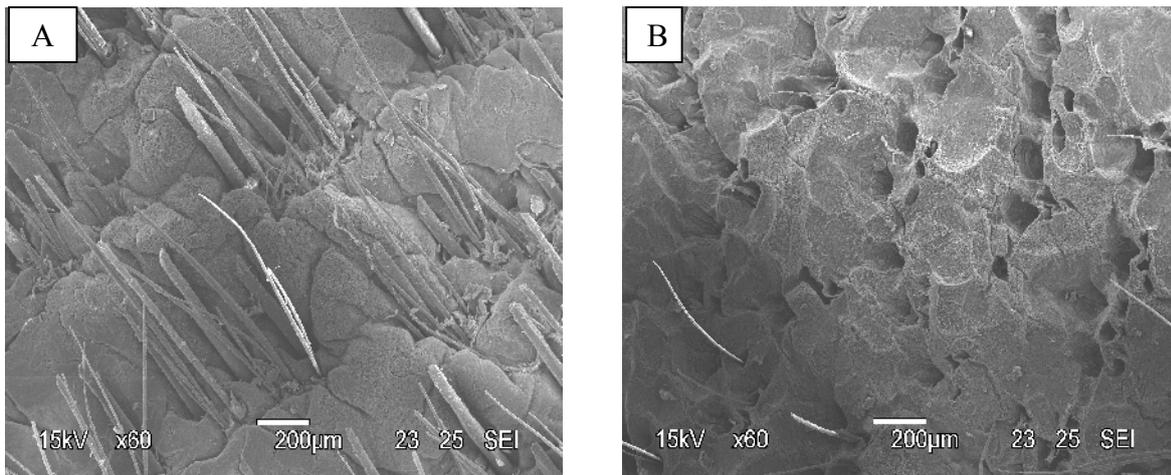


Figure 19. Photos montrant la microstructure de la peau sèche A) PS1 B) PS2

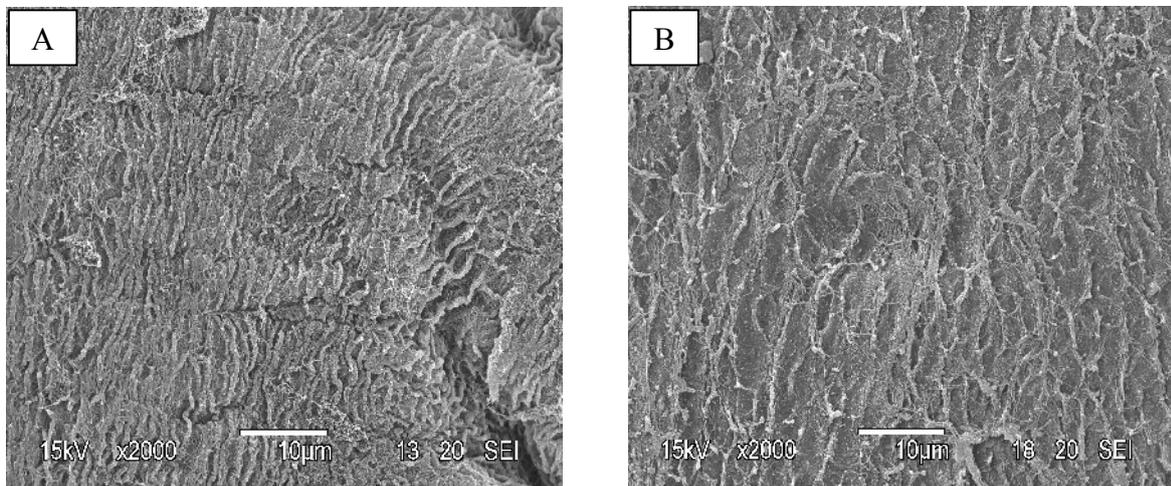


Figure 20. Photos montrant la structure fibreuse de peau fraîche et sèche. A) Peau fraîche ; B) Peau sèche

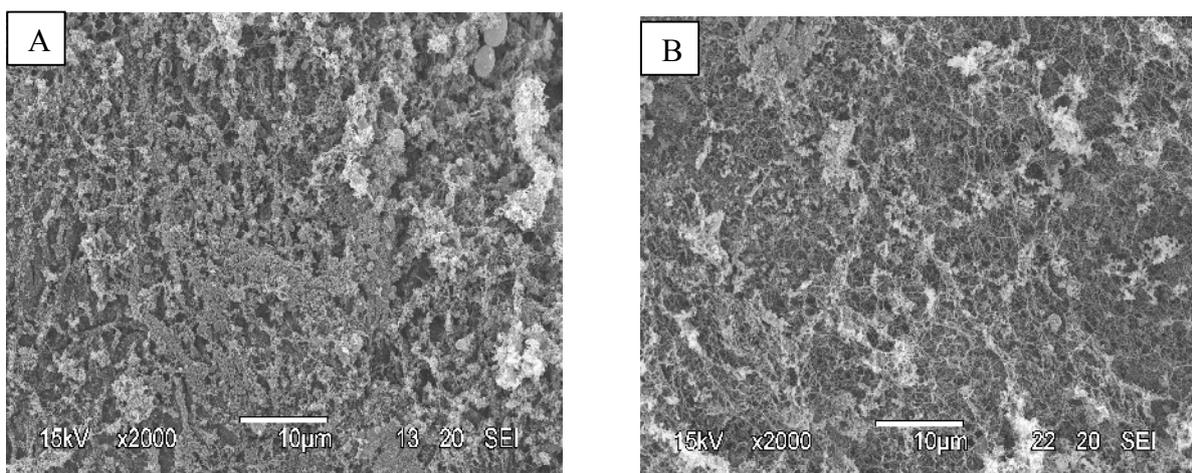


Figure 21. Photos montrant la structure fibreuse (invisible) de peau fraîche (A) et sèche (B) recouverte partiellement ou presque entièrement avec les granules de caséines

5.1.2. Résultats d'analyse qualitative

5.1.2.1. Biofilm des peaux de chèvre

Le biofilm des deux peaux de chèvre présente la même composition qualitative (coques, bâtonnets, les coques sont prédominant sur les bâtonnets, levures, moisissures)

Une différence quantitative a été constatée dans le biofilm des deux peaux de chèvre à l'exception de PS1 et PS2 (Figure 22). Le biofilm de PF1 est moins riche que le biofilm de PF2 (Figure 23) ainsi que PF1Lb est moins riche en micro-organismes que PF2Lb (Figure 24). Le biofilm de PS1Lb est moins riche en micro-organismes que le biofilm de PS2Lb (Figure 25).

5.1.2.2. Effet *lben* sur le biofilm des peaux de chèvre

Conformément aux résultats microbiologiques, le biofilm de la peau après contact avec *lben* est beaucoup plus riche que le biofilm de la même peau avant contact avec *Lben*.

Dans les peaux fraîches et sèches avant contact avec *lben* (figure 22, 23), les diplocoques et les bâtonnets se trouvent isolés ou jointes respectivement en courte chaîne, avec l'absence de levures. Mais après contact avec *lben*, les peaux fraîches et sèches ont été caractérisées par l'augmentation de densité microbienne avec l'apparition de levures organisés en couple, en courte et en longue chaîne (Figure 24, 25, 26, 27, 28, 29). Les diplocoques sont plus nombreux que les bâtonnets (Figure 25, 28, 29).

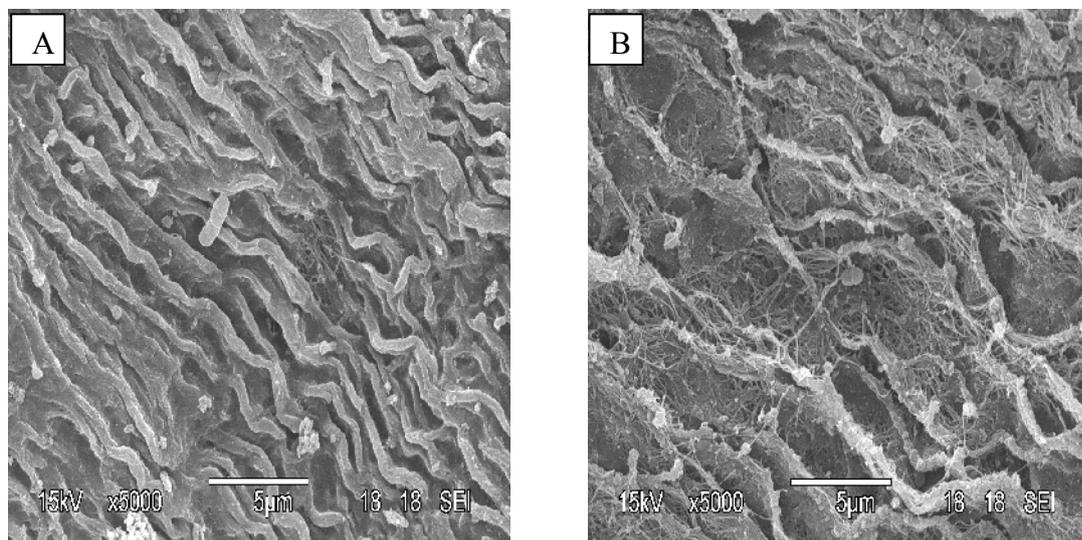


Figure 22. Biofilm des deux peaux sèche A) PS1 et B) PS2

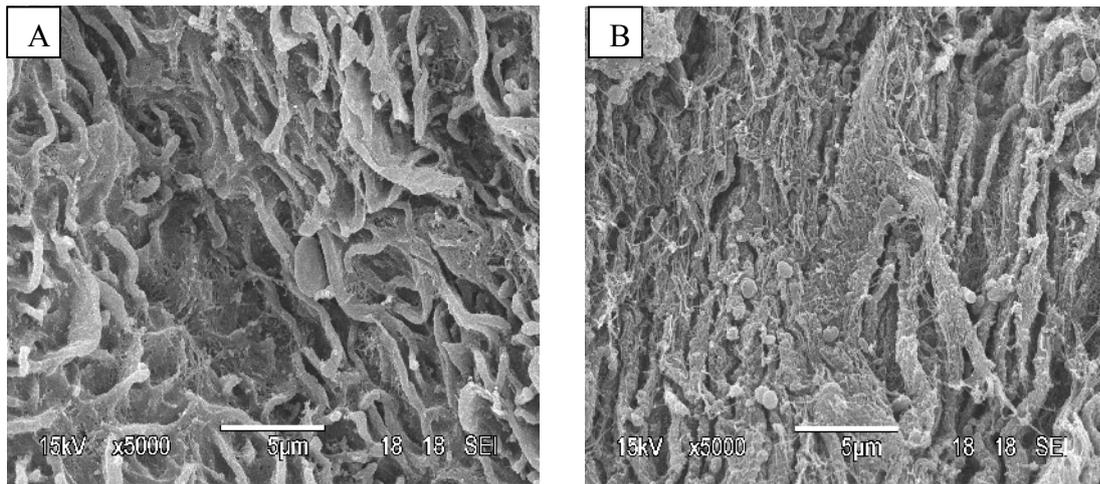


Figure 23. Biofilm des deux peaux fraîche A) PF1 et B) PF2

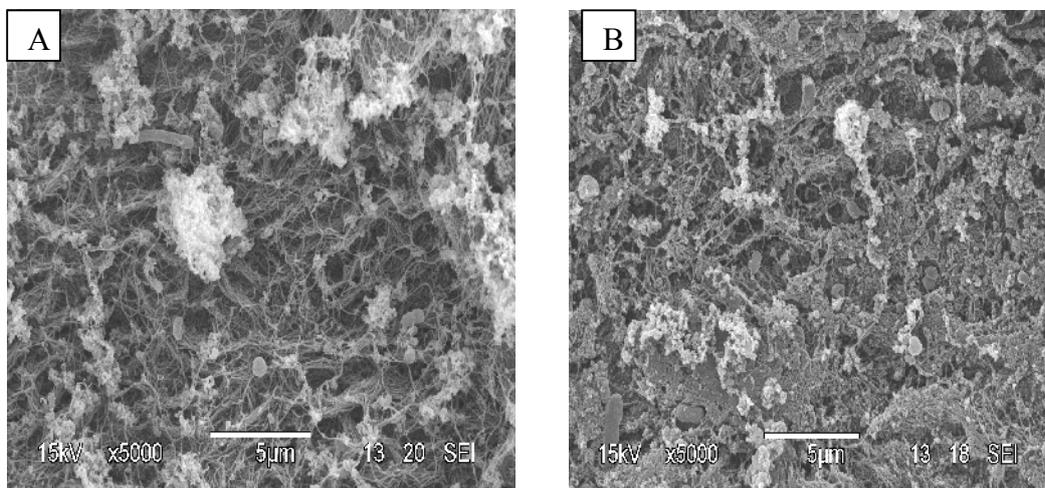


Figure 24. Biofilm des deux peaux fraîche après contact avec *Iben* A) PF1Lb et B) PF2Lb

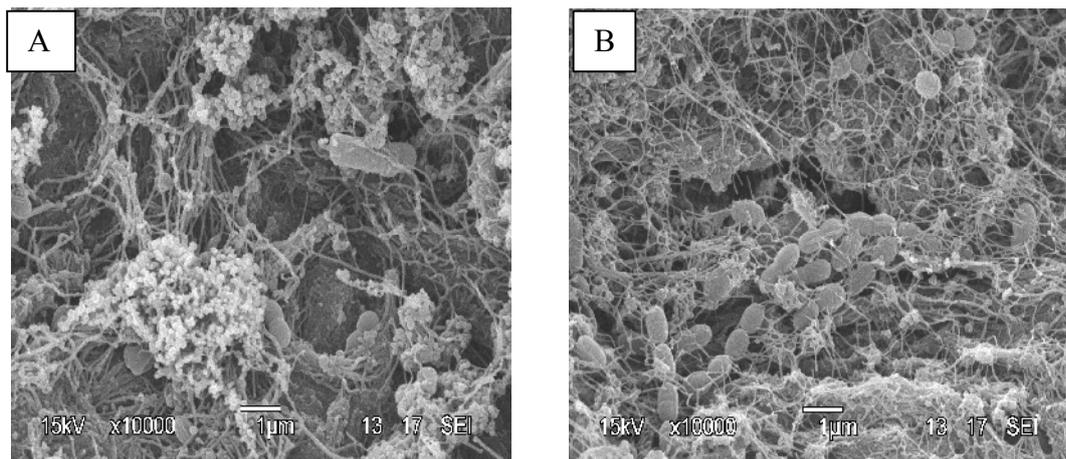


Figure 25. Biofilm des peaux sèche après contact avec *Iben* A) PS1Lb ;B)PS2Lb

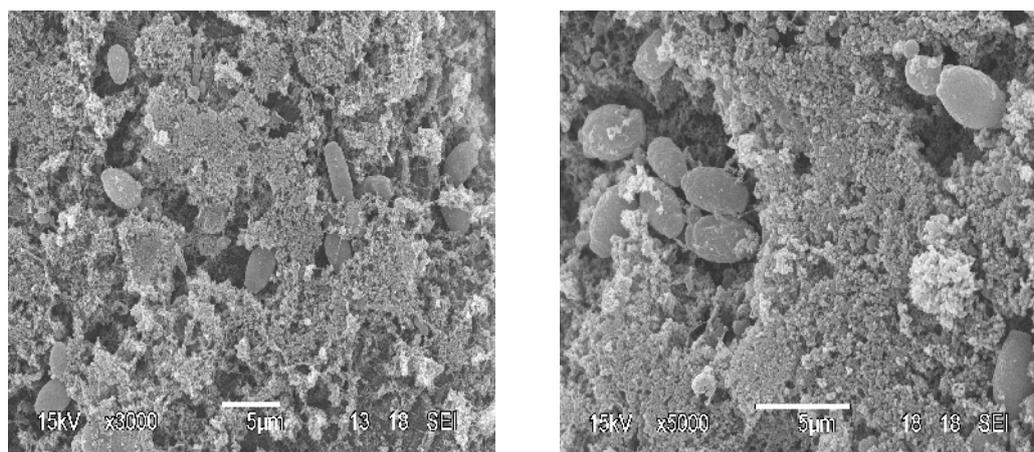


Figure 26. Biofilm de peau fraîche après contact avec *lben* (PF2Lb)

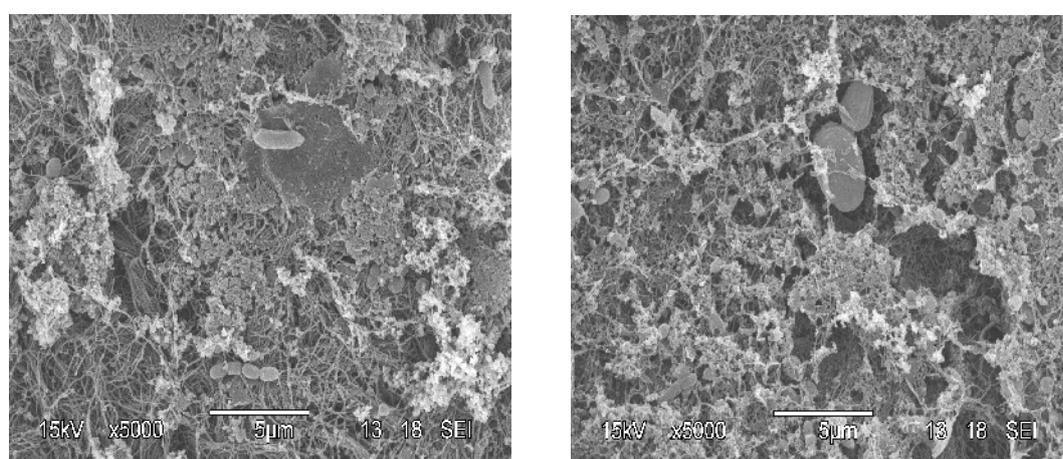


Figure 27. Biofilm de la peau fraîche après contact avec *lben* (PF1Lb)

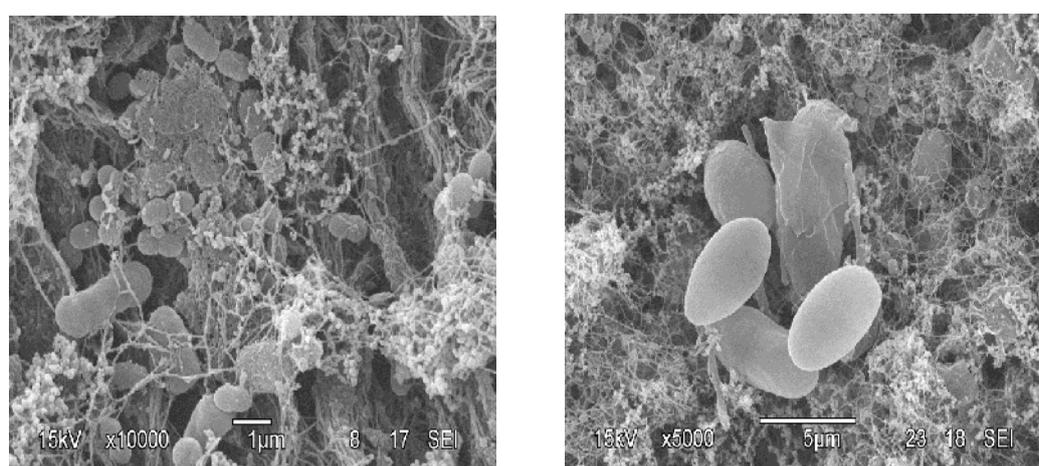


Figure 28. Biofilm de peau sèche après contact avec *lben* PS1Lb

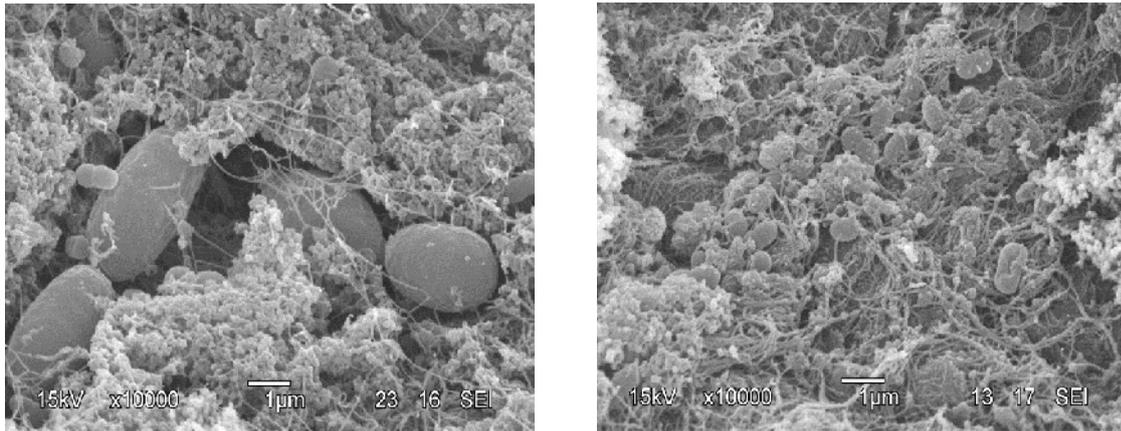


Figure 29 .Biofilm de peau sèche après contact avec *lben* PS2Lb

5.2. Résultats d'analyse par le Microscope confocal à balayage laser

L'étude de la peau de chèvre avec le microscope confocal à balayage laser permet de caractériser d'une part la microstructure de la peau et d'autre part la viabilité et la répartition des micro-organismes sur le biofilm de la peau.

L'observation microscopique a permis de révéler quelques différences entre les échantillons de peau de chèvre analysés avant et après contact avec *lben*. Les échantillons de peau examinés avant l'addition du *lben* (PF1, PF2, PS1, PS2) ont montré une faible densité bactérienne (figure 30 et 31) en comparaison avec les échantillons de peau analysés après contact avec *lben* (PF1Lb, PF2Lb, PS1Lb, PS2Lb). Les peaux non utilisées sont presque vides en bactéries, seulement PF1 et PF2 ont montré en particulier quelques bactéries isolées et quelques levures.

Conformément aux résultats d'analyse microbiologique, l'échantillon de peau sèche (PS1) était légèrement plus riche en microorganismes que les autres échantillons de peau analysés avant contact avec *lben* (figure 32). Sa microstructure semble avoir de plus grands pores en comparaison avec les échantillons de peau fraîche (figure 33). Une alternance de zone vides et de zones riches en microorganismes a été constatée au niveau de PS2 (figure 34).

Les peaux examinées après contact avec *lben* ont été colonisées par un grand nombre de bactéries et quelques levures. Dans PF2Lb, les bactéries ont été apparues principalement organisées en chaînes et des moisissures occasionnellement retrouvés (Figure 36), aussi PS1Lb a été colonisé par des bactéries et quelques levures isolées et mortes (Figure 37).

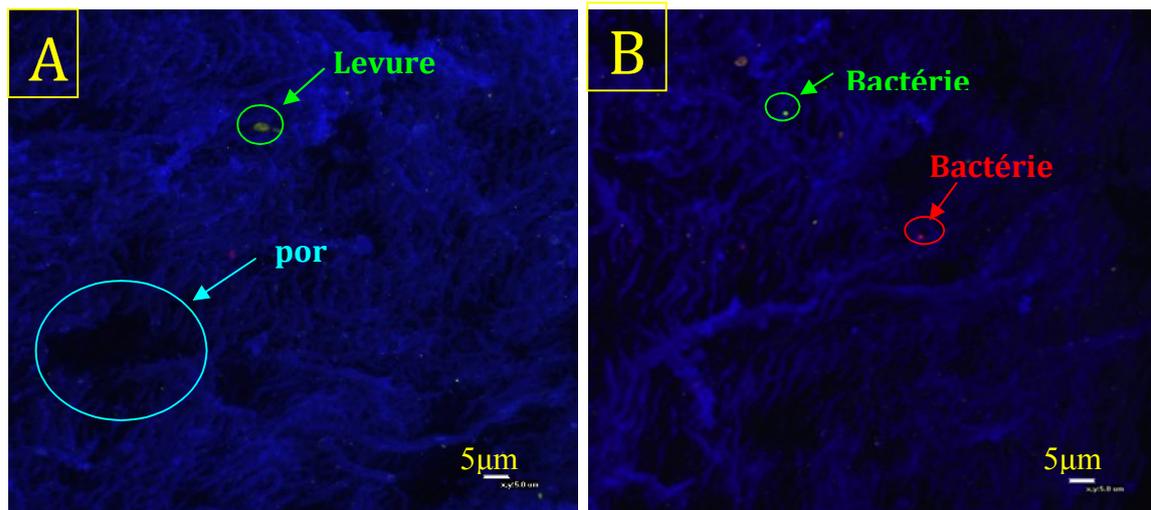


Figure 30. Photos (image) montrent PF1 (la peau codée en bleu) presque vide, juste quelques cellules isolées

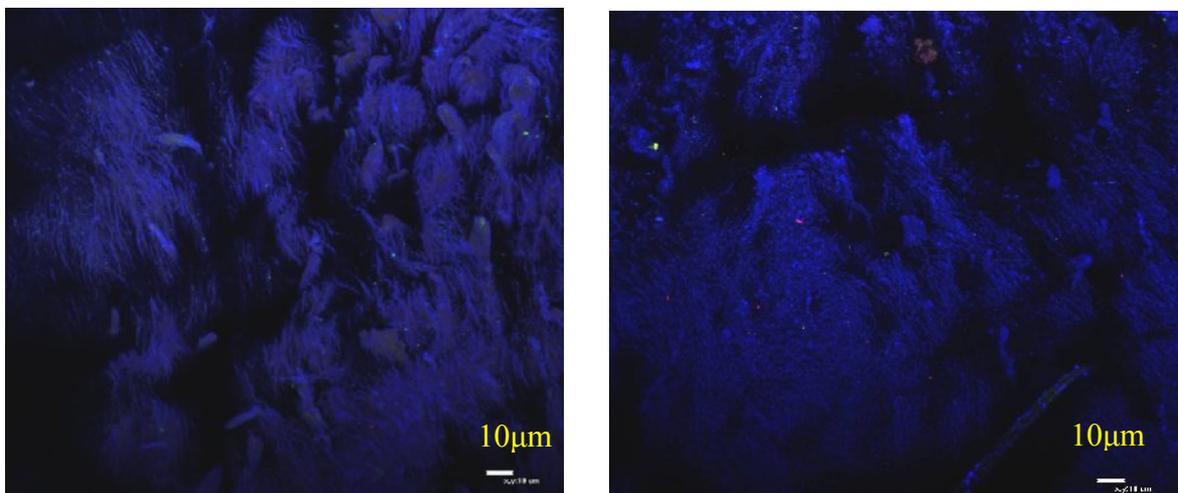


Figure 31. Photo montre PF2 (la peau codée en bleu) presque vide, juste quelques cellules détectées (codées en vert et en rouge)

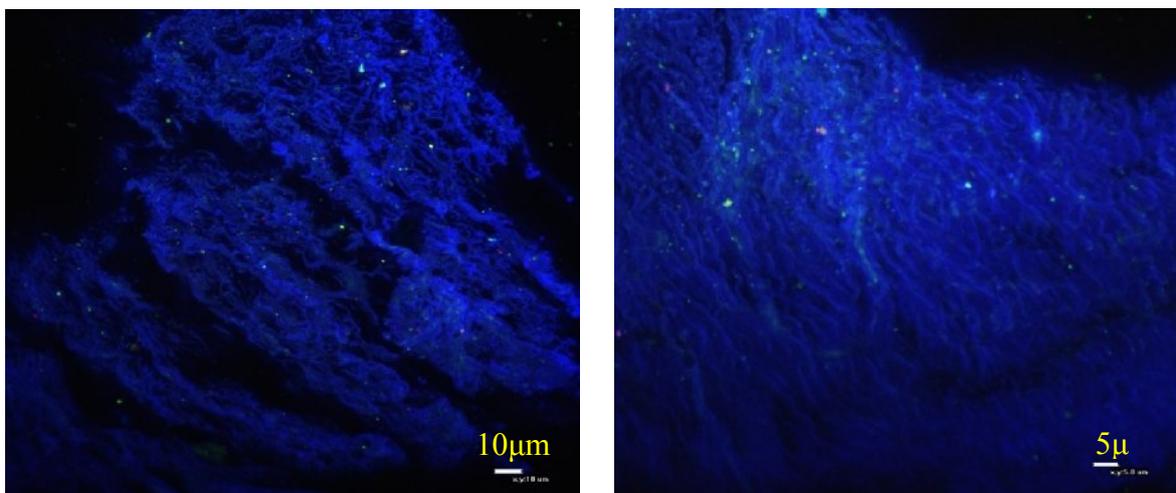


Figure 32. Photo montre PS1 (la peau codée en bleu) légèrement colonisé en microorganismes, les microorganismes vivants sont codés en vert et les cellules mortes sont codées en rouge

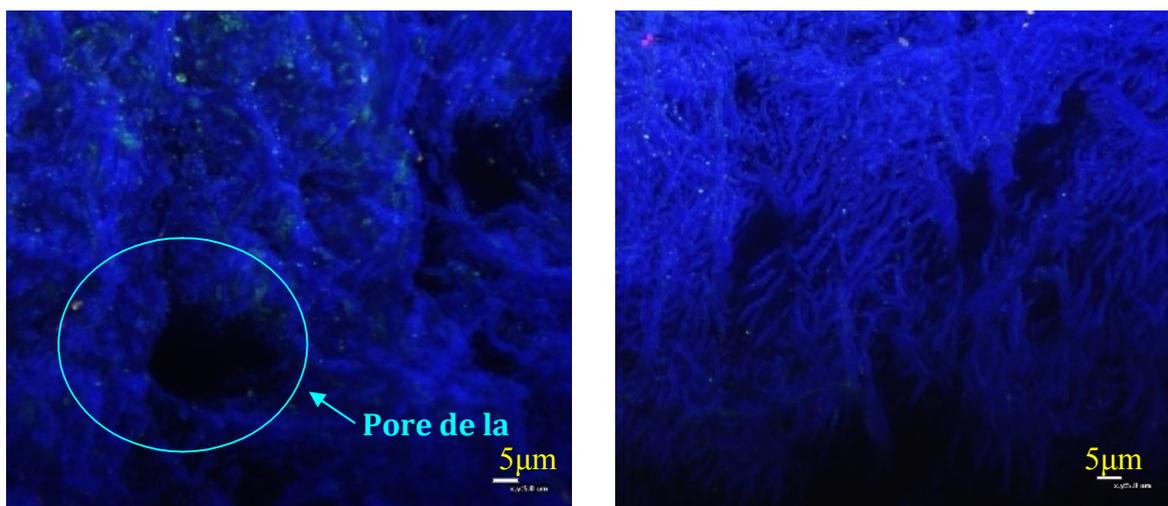


Figure 33. Photo montre les pores de PS1. Les pores de cette peau sont plus grands que les pores des peaux fraîches

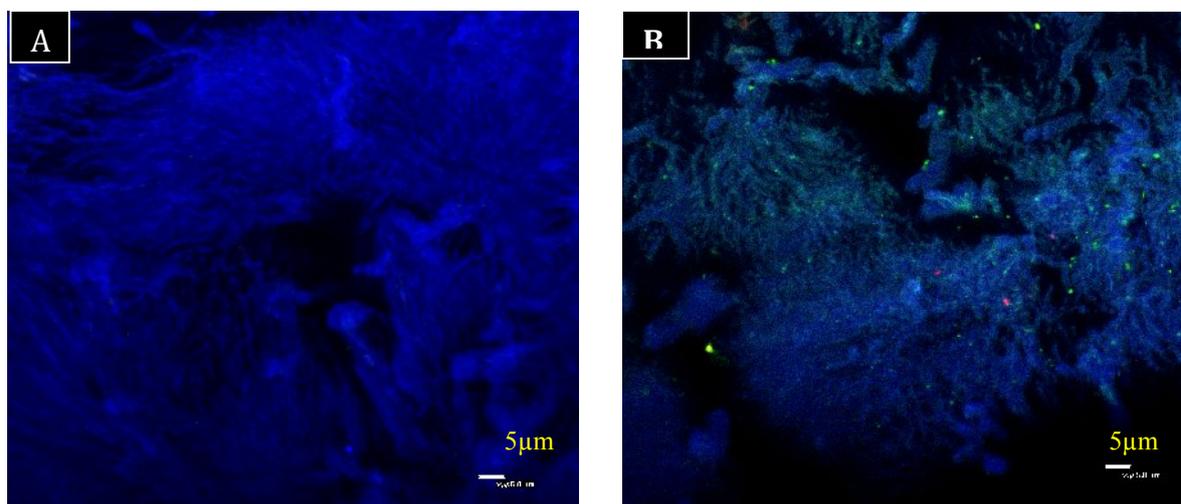


Figure 34. Photo montre PS2 A) Zone vide, B) Zone colonisée

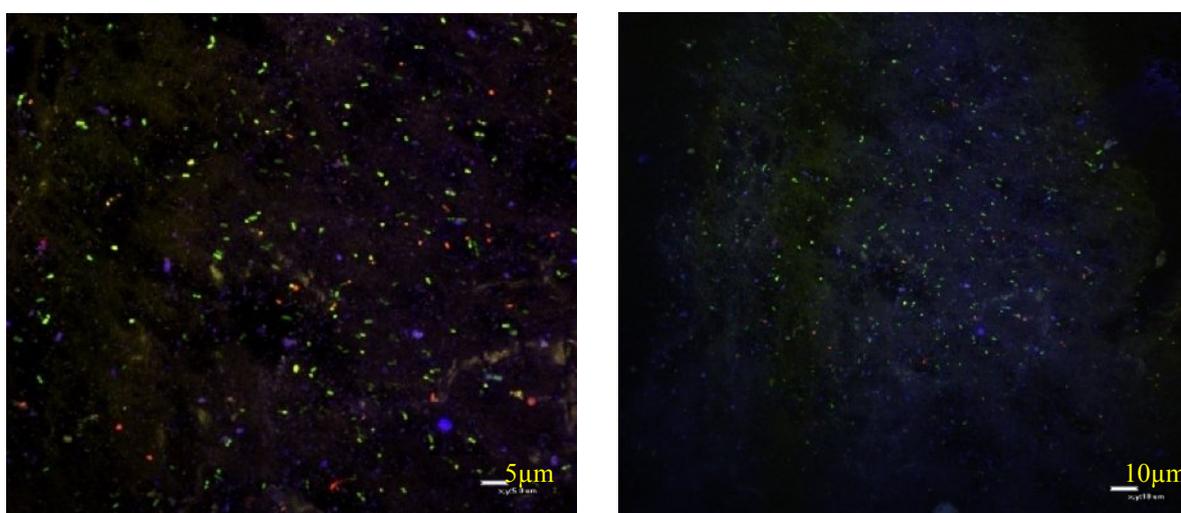


Figure 35. Photo montre PF1Lb, l'échantillon est colonisé de nombreux microorganismes

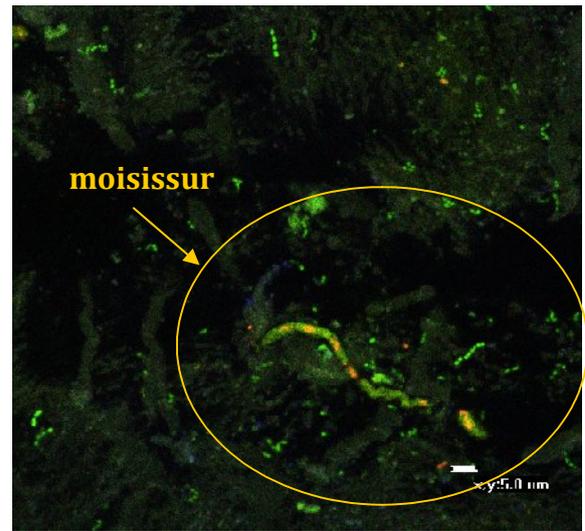
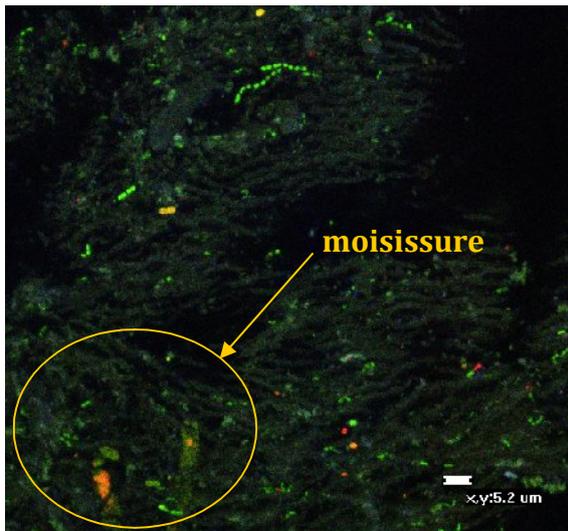


Figure 36. PF2Lb. bactéries organisées en chaîne et moisissures occasionnelles

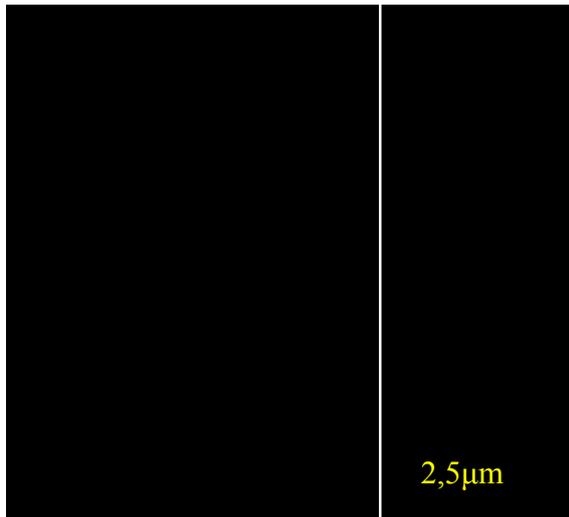


Figure 37. PS1Lb, densité bactérienne élevée. Quelques bactéries mortes et isolées et une seule levure isolée.

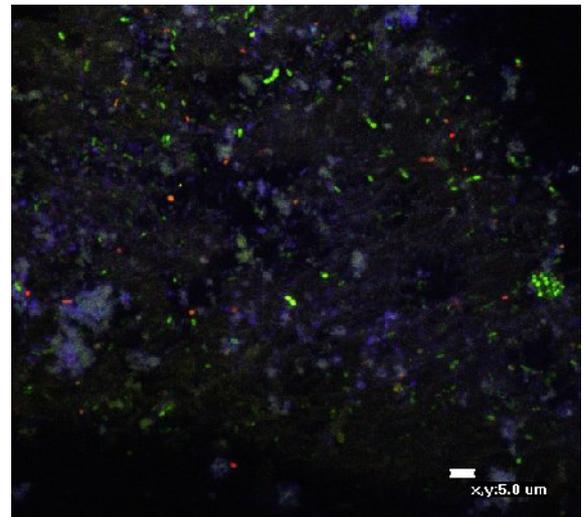


Figure 38. PS2Lb, bactéries (vivantes et mortes) et des levures isolées mortes

Conclusion

Conclusion

A travers cette recherche, nous apportons notre contribution à la caractérisation microbiologique de la peau de chèvre (*Chekoua*) utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel « *Bouhezza* ». Cette caractérisation a porté sur quelques aspects et a abouti aux conclusions suivantes :

Sur le plan de la caractérisation microbiologique, la microflore initiale de la *chekoua* est caractérisée par une faible charge de bactéries mésophiles et absence de levures, de moisissures. L'absence de la flore pathogène est un résultat intéressant pour la qualité du fromage. Le *Iben*, utilisé pour le dernier rinçage de la *chekoua* induit une élévation de la charge microbienne avec apparition de levures. L'identification de l'écosystème microbien de la peau de chèvre par la PCR-TTGE a montré une diversification microbienne avec prédominance des bactéries lactiques. Un échange de microorganismes a été noté entre la *chekoua* et le *Iben* durant une nuit de contact.

D'autre part l'étude de la microstructure de la *chekoua* avant et après contact avec *Iben* a montré la structure de la peau de chèvre. L'observation microscopique au MEB a révélé une surface ridée caractérisée par des plis cutanés. Les fibres sont plus épaisses et bien distinctes dans la peau fraîche contrairement à la peau sèche qui a montré des fibres presque fusionnées. Le diamètre des pores varie entre 41 à 140µm dans la *chekoua* fraîche et entre 34 et 121 µm dans la *chekoua* sèche. Aussi, l'observation microscopique par MEB et MCBL a montré l'enrichissement microbien de biofilm de la *chekoua* après contact avec le *Iben*. Les microorganismes présents sont sous forme de diplocoques, de bacilles et de levures. Par ailleurs, la MCBL a révélé la présence de bactéries vivantes et mortes dans les quatre sacs.

L'ensemble des résultats aux quels a abouti cette étude constitue une contribution scientifique s'inscrivant dans la continuité des travaux de caractérisation du fromage *Bouhezza* qui mériterait d'être compléter.

En perspective, il serait intéressant de :

- Choisir le mode de traitement de la peau qui convient le mieux pour la fabrication du fromage et la préservation de sa qualité microbiologique ;
- Etudier l'effet de la variabilité animale sur la qualité du fromage *Bouhezza* ;

- Etudier l'effet de l'utilisation de sacs en toile à la place de la *Chekoua* sur les caractéristiques du fromage.
- Envisager des approches expérimentales pour expliquer l'effet de l'écosystème microbien du fromage ou de la peau de chèvre sur les germes pathogènes.

*Références
bibliographiques*

- ABDELGADIR W.S., AHMED T.K., and DIRAR H.A., 1998.** Review: The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal of Food Microbiology*, 44:1-13
- AFNOR, 1993.** *Recueil des normes françaises*. Contrôle de la qualité des produits alimentaire : lait et produits laitiers. Analyse physicochimique. Paris. 4^{ème} édition. 561p.
- AISSAOUI ZITOUN O., 2004.** Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnelle algérien « Bouhezza ». *Mémoire de Magister*. Université Mentouri de Constantine. 134p.
- AISSAOUI ZITOUN O., (Thèse en cours).** Fabrication et caractérisation d'un fromage traditionnel Bouhezza. *Thèse de doctorat*. INATAA, Université Mentouri Constantine.
- AISSAOUI ZITOUN O., BENATALLAH L., GHENNAM E.H. et ZIDOUNE M.N., 2011a.** Manufacture and characteristics of the traditional Algerian ripened Bouhezza cheese. *Journal of Food, Agriculture & environment*. Vol .9 (2):196-100.
- AISSAOUI ZITOUN O., FUCA N., PEDILIGGIERI C., TUMENELLO L., ZIDOUN M.N., LICITRA G. and CARPINO S., 2011b.** Ecosystem characterization of « goatskin » biofilm. *Poster IDF World Dairy Congress*, Athens, Greece, May 16-18, 2011.
- AISSAOUI ZITOUN O., PEDILIGGIERI C., BENATALLAH L., LORTAL S., LICITRA G., ZIDOUNE M.N and CARPINO S., 2012.** Bouhezza, a traditional Algerian raw milk cheese, made and ripened in goat skin bags. *Journal of Food, Agriculture & Environment*,10(2) :289-295.
- AISSAOUI ZITOUN O. et ZIDOUNE M.N., 2006.** Le fromage traditionnel algérien Bouhezza. *Séminaire d'Animation Régional Technologies douces et procédés de séparation*. AUF-GP3A-INSAT, Tunis, Tunisie,.118-124.
- ALAIS C., 1984.** Science du lait. Principe des techniques laitières. IV édition. Ed Sépaic, Paris. 814 p
- ALAIS C. et LINDEN G., 1997.** Abrégé de biochimie alimentaire. 4^{ème} édition Masson, 284p.
- ALOMAR J., 2007.** Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. *Thèse de Doctorat*. Institut polytechnique de Lorraine (INPL).
- AMIOT J., FOURNIER., LEBEUF Y., PAQUIN P., et SIMPSON R., 2002.** Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In Vighola C.L., Science et technologie du lait transformation du lait. *Fondation de Technologie laitière du Québec*, Presses internationales polytechnique 600p.

- AMANN R.I. , LUDWIG W. et SCHLEIFER K.H. , 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*.59 : 143-169.
- ANONYME, 2007.** Dupont Qualicon Bax[®] System User Guide.
- AOAC, 2010.** AOAC Official methods of analysis 18th edition. AOAC Official method 2003.12, *Listeria monocytogenes* in foods BAX[®] Automated system In Microbiological Methods, Chapter 17, p.252.
- AYACHE J., BEAUNIER L., BOUMENDIL J.P., EHRET G. et LAUB D., 2007.** Guide de préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission. Tome 1 « Méthodologie ». Editeur : Publication de l'Université de Saint-Etienne (PUSE).
- BAILY D.G., 2003.** Preservation of Hides and Skins. *Journal of the American Leather Chemists Association*, R6706: 1-16.
- BAKER G.C., SMITH J.J. et COWAN D.A., 2003.** Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*. 55 :541-555.
- BEDIARE N. et BENHANAYA H., 2006.** Caractérisation physico-chimiques et microbiologique du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme et de commerce (wilayas de Batna et de Khenchela, 2006). *Mémoire d'ingénieur*. INATAA. Université
- BELLEFLAMME C., DI TANNA S., SINDIC M., 2006.** Le risque *Listeria monocytogenes* pour la transformation laitière fermière. *Filière Ovine et Caprine n°18, octobre*.
- BEN AMOR K., CORNELIUS A., MAHJOUB A., THONART PH., 1998.** Identification de la flore lactique du lait fermenté traditionnel tunisien (Lben) et évaluation des composés aromatisants. *Microb. Hyg. Alim.* 10, 31-36.
- BENKERROUM N. et TAMIME A.Y., 2004.** Technology transfer of some moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*.21 : 399-413.
- BENMESSAI W. et FETHALLAH Z., 2009.** Suivi des caractéristiques physico-chimiques de *Bouhezza* au lait de vache et de mélange (vache et chèvre). *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri Constantine.86p.
- BERESFORD T.P., FITZSIMONS N.A., BRENNAN N.L., COGAN T.M., 2001.** Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259-274
- BERNARDEAU M., VERNOUX J.P., DUBERNET S., GUEGUEN M., 2008.** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (3): 278-285

- BRANGER A., RICHER M. et ROUSTEL S., 2007.** Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Edition : Martine Poillot. Educagri éditions, Dijon. 208p.
- BRODEUR J. et TOUSSAINT M., 2007.** Biologie moléculaire : Concepts, Techniques, Applications. Bibliothèque nationale du QUÉBEC. 331p.
- BRULE G., LENOIR J. et REMEUF F., 1997.** La micelle de caséine et la coagulation du lait *In* Le fromage. Ed., A. Eck, 3^{ème}Ed., Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp.7-41.
- BS EN ISO 4833: 2003.** Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganismes- Colony-count technique at 30 degrees C.
- CHARLIER C., EVEN S., GAUTIER M. et LE LOIR Y., 2008.** Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal* **18** (2), 197-203.
- CHAUMANDE B., 2011.** Apport des analyses protéomiques et métallogprotéomiques pour l'étude de la géophagie. *Thèse de doctorat*. Université de Strasbourg. 258p.
Mentouri Constantine.57p.
- CHEVROU M. et ROUDIERE A., 2004.** Les biofilms. Option méthodologies d'analyses, *projet binomé*. École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. 29p
- CORROLER D., DESMASURES N., GUÉGUEN M., 1999.** Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 91-99.
- DAVID E., ANDERSON, MICHAEL RINGS D., PUGH D.G. 2002.** Diseases of the integumentary system *In* : Pugh D.G. (eds), *Sheep and Goat Medicine*. First edition. Saunders. Philadelphia, pp.197-222.
- DE BUYZER M.L, 1991.** Chapitre 6 : les staphylocoques coagulase positifs dans les aliments, Partie III : Méthodes d'évaluation des microflore à incidence sanitaire *In* *In* Bourgois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA, Vol 3 : Le contrôle microbiologique. 2^{ème} édition. Tec et Doc. APRIA. 454p.
- DELLAGLIO F., DE ROISSART H., TORRIANI S., CURK M.C. et JANSSENS D., 1994.** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries Lactiques (Tome I), Lorica (ed), 25-70.
- DE VERNEUIL H., 2003.** Troisième partie: Le génome et son expression. Chapitre 11. Méthodes d'étude du génome du transcriptome et du protéome *In* Biochimie et biologie moléculaire. Flammarion. Médecine-Science. Paris. Pp 121-134. 473p.

- ELBARADEI G., DELACROIX-BUCHET A. et OCIER J.C., 2008.** Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*. 121:295-301.
- ERCOLINI D., 2004.** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56 :297-314.
- ERCOLINI D., FRISSE G., MAURIELLO G., SALVATORE F. and COPPOLA S., 2008.** Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int.J.Food. Microbiol*, 96: pp 263-270.
- FIGUEIREDO.E.A.P., SHELTON M. and PANT K.P., 1982.** Goat skins. Pro *3rd International Conference Goat*. La documentation caprine.net. Pp 488-490.
- FOX P.F., GUINEE T.P., COGON T.M. and MCSWEENEY P.L.H., 2000.** Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg, MD : Aspen Publishers Inc.*
- FOX P.F., 1982.** Exogenous enzymes in dairy technology. In utilisation des enzymes en technologie alimentaire. Dupy P. Tec.et Doc., pp135-157.
- FOX P.F.and MCSWEENEY P.L.H., 2004.** Cheese: an overview, pp.1-19. *In:* Fox P.H., Mcsweeney P.L.H., Cogan T., Guinee T. (Eds), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, San Diego, 564p.
- FRANCHIN P.R., OGLIARI P.J., ANDRADE D.F., CHIAPINOTO M., LEMOS G., REBELLATTO M., DA SILVA I.G. and BATISTA C.R.V., 2006.** Comparaison of the Bax[®] System with an in- house MSRV method for the detection of salmonella in chicken carcasses and pork meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37 :521-526.
- GANESH BABU T., NITHYANANO P., CHANDRABABU N.K. and KARUTHA PANDIAN S., 2009.** Evaluation of cetyltrimethylammonium bromide as a potential short-term preservative agent for stripped goat skin. *World J. Microbiol Biotechnol*, 25 : 901-907.
- GELAIS-St. D. TIRARD-C. P. BÉLANGER G. COUTURE R. et DRAPEAU R., 2002.** Chapitre 6 : Fromage *In Science et technologie du lait, transformation du lait*. Ed VIGNOLA. Edition école polytechnique. Pp 349-412. 600p.
- GIRAFFA & NEVIANIE., 2001.** DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food- associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*.67 :19-34.
- GODON J.J., DUTHOIT F., DELBÈS C., MILLET L., et MONTEL M.C., 2001.** Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens

complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru « l'AOC Salers ». *Lait*. 81: 257-262.

GOURSAUD J., (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. In : LUQUET, F.M. Lait et produits laitiers. 1^{ère} éd. Paris: Technique et documentation Lavoisier, Vol.1, Chap.1, Pp. 1-90

GUIRAUD J.P., 2003. Microbiologie alimentaire.DUNOD. Paris. 651p

HAYALOGLU A.A., FOX P.F., GUVEN M., CAKMAKCI S. (2007b): Cheeses of Turkey: Review 1. Varieties ripened in goat- skin bags. *Le Lait* 87, 79-95.

HENRI-DUBERNET S., DESMASURES N. and GUÉGHEN M., 2004. Culture dependent and culture independent methods for molecular analysis of the diversity of lactobacilli in « Camembert de Normandie » cheese. *Lait*, 84 :179-189.

HOLZAPFEL W.H., GEISEN R., and SCHILLINGER U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food- grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.

HOOI R., BARBANO D. M., BRADLEY R.L., BUDDE D., BULTHAUS M., CHETTIAR M., LYNCH J. and REDDY R., 2004. Chemical and Physical Methods – Chapter 15. In WEHR H.M. and FRANK J.F., 2004. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17th Édition. *The American Public Health Association*.

IRLINGER F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologiques, de la surface des fromages. *Thèse de doctorat*, Institut National Agronomique. Paris- Grignon, 172p.

ISO 7889 IDF-117: 2003. Yogurt-Enumeration of characteristic microorganisms- Colony-count technique at 37°C. First edition.

ISO 6611-IDF 94: 2004. Milk and milk products- Enumeration of colony- forming units of yeasts and/or moulds- Colony-count technique at 25°C. Second edition.

ISO/TS 17837/IDF /RM 25: 2008. Processed cheese products- Determination of nitrogen content and crude protein calculation- Kjeldahl method. First edition. *Technical specification*.13p

JANY J.L. and BARBIER G., 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese: review. *Food Microbiology*.25: 839-848.

JEANTET R., CROGUENNEC T., MADRANT M., SCHUCK P. et BRULE G., 2008. Les produits laitiers, 2^{ème} édition. Tec et Doc Lavoisier, 185p.

Journal Officiel de la République Algérienne, 1993 Arrêté interministériel de 29 safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et la présentation de certains laits de consommation.

JUSTÉ A., THOMMA B.P.H.J., et LIEVENS B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food- associated matrices and processes. *Food Microbiology*. 25:745-761.

KANAGARAJ J., JOHN SUNDAR V., MURALIDHARAN C. and SADULLA S., 2005a. Alternatives to sodium chloride in prevention of skin protein degradation-a case study. *Journal of Cleaner Production*, 13: 825-831.

KANAGARAJ J., SASTRY T.P. and ROSE C., 2005b. Effective preservation of raw goat skins for the reduction of total dissolved solids. *Journal of Cleaner Production*, 13: 959-964

KANAWJIA S.K., NAGESWARA RAO K., SINGH S., SABIKHI L., 1996. Role of lactobacilli in cheese. *Indian Journal of Dairy Science*, 46.187-197.

KECHA H., 1987. Contribution à l'étude physicochimique et microbiologique du lben artisanal fabriqué à Constantine. *Mémoire d'ingénieur*. INATAA. Université Mentouri Constantine, 35p.

KIERONEZYK A., SKEIE S., LANGSRUD T., YVON M., 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and non starter lactobacilli in the formation of cheese aroma amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 734-739.

LAFARGE V., OGIER J.C., GIRARD V., MALADEN V., LEVEAU J. et DELACROIX-BUCHET A., 2004. Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Le lait* 84 :169-179

LAMONTAGNE M., CHAMPAGNE P.C., REITZ-AUSSEUR J., MOINEAU S., GARDNER N., LAMOUREUX M., JEAN J et FLISS I., 2002. Chapitre 2 : Microbiologie du lait *In* Science et technologie du lait. Ed VIGNOLA ; Edition école polytechnique. Pp 75-146. 600p

LICITRA G., OGIER J.C., PARAYRE S., PEDILIGIERI C., CARNEMOLLA T.M., FALENTIN H., MADEC M.N., CARPINO S. and LORTAL S., 2007. Variability of the bacterial biofilms of the «Tina» wood vat used in the Ragusano cheese making process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 : 6980-6987.

LEMOUCHI L., 2007. Le fromage traditionnel *Bouhezza* : enquête de la Wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri Constantine. 65p.

- LIONEL B., 2005.** Travail des peaux d'ovins et caprins en mégisserie française et principaux facteurs influençant la qualité des cuirs. Ecole nationale vétérinaire de Lyon, *Thèse de doctorat*. 79p
- LORTAL S., DI BLASI A., MADEC M.N., PEDILIGGIERI C., TUMINELLO L., TANGUY G., FAUQUANT J., LECUONA Y., CAMPO P., CARPINO S. and LICITRA G., 2009.** Tina wood vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International journal of Food Microbiology*, 132 : 1-8.
- MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G., 2000.** Initiation à la technologie fromagère. Tec & Doc.
- MAILLET M., 2006.** Biologie cellulaire. Avec la collaboration de LEMULLOIS M. 10^{ème} édition entièrement refondue. ELSEVIER MASSON.
- MANIGUET L., REPOUX M., RUSTE J. and ROUSSEL-DHERBEY F., 2008.** Introduction *In* Brisset F., Microscopie électronique à balayage et microanalyses. EDF Science. 892p.
- MAS M., TABLA R., MORICHE J., ROA I., GONZALEZ J., REBOLLO J.E. and CACERES P., 2002.** Ibores goat's milk cheese: microbiological and physic-chemical changes throught ripening. *Le lait*, 82: 579-587
- MATHIEU J., 1997.** Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tec et Doc. 214p.
- MICHAEL M.J. and MØLLER G.M., 2006.** PCR the basics. Second edition by Taylor & Francis Groupe. 292p.
- MICHEL V., HAUWUY A. et CHAMBA J.F., 2001.** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Le lait*, 81 :575-592
- MONTEL M.C., CALLON C., DUTHOIT F. et MILLET L., 2002.** Atout de la diversité microbienne pour les fromages au lait cru de montagne. Laboratoire de recherches fromagères, INRA Aurillac 76-79.
- MUYZER G., BRINKHOFF T., NÜBEL U., SANTEGEODS C., SCHÄFER H. et WAWER C., 1998.** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manuel*. A.D.L. Akkermans, J. Drink van Elsaset F. J. de Bruijn. Dordrecht/Boston/London, Kulwer Academic Publishers. **3.4.4 :1-27**
- MUYZER G. et SMALLA K., 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van leeuwenhoek* 73 :127-141.

- MYERS R.M., MANIATIS T. et LERMAN L.S., (1987)** « detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis ». *Meth. Enzymol.* 155 : 501-527.
- OCIER J.C., SON O., GRUSS A., TAILLIEZ P. and DELACROIX-BUCHET A., 2002.** Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental Microbiology.* 68 (8) :3691-3701.
- OGIER J.C., LAFARGE V., GIRARD V., RAULT A., MALADEN V., GRUSS A. et LEVEAU J. and DELACROIX-BUCHET A., 2004.** Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental Microbiology.* 70 :628-5643.
- OUADGHIRI M., 2009.** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « *Lben* » et « *Jben* » d'origine marocaine. *Thèse de Doctorat.* Université MOHAMMED V-AGDAL, Faculté des Sciences. Rabat. 132p.
- PAQUETON H. et RUSTE J., 2006.** Microscope électronique à balayage. Principe et équipement. *Techniques de l'ingénieur.* P865v2
- PARAYARE S., FALENTIN H., MADEC M.N., SIVIERI K., LE DIZES A.S., SOHIER D. and LORTAL S., 2007.** Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low G.C-content bacteria from dairy products, *J.Microbiol. Methods.* 69 :431-441.
- POZNANSKI E., CAVAZZA A., CAPPÀ F. and COCCONCELLI P.S., 2004.** Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology,* 92 :141-191.
- PRIMSON S., TWYMAN R. et OLD R., 2004.** Principe de génie génétique. 6^{ème} édition. Eds. De Boeck. 400p.
- RACHEF R., 2006.** Caractérisation du fromage traditionnel algérien *Bouhezza* de ferme et de commerce. *Mémoire d'ingénieur.* INATAA. Université Mentouri Constantine.57p
- RAMET J. P., 1985.** La fromagerie et les variétés de bassin méditerranées. 187p
- RAMET J.P., 1987.** La préparation du caillé. *In* Le fromage. A. Eck. 2^{ème} édition Tec et Doc.
- RANDAZZO C.L., CAGGIA C. and NEVIANI E., 2009.** Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods.* 78 :1-9.
- RANDAZZO C.L., TORRIANI S., AKKERMANS A.D., DE VOS W.M. et VAUGHAN E.E., 2002.** Diversity dynamics and activity of bacterial communities during production of an

artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and environmental Microbiology*. 68 : 1882-1892.

RICHARD J., 1983. Comparaison of dominant and subdominant flora of milk of poor biological quality. *Le lait*, 63 :148-170.

SAMET-BALI O., BELLILA A., AYADI M.A., MARZOUK B. and ATTIA H., 2010. A composition of the physico-chemical, microbiological and aromatic composition of Traditional and Industrial Leben in Tunisia. *International Journal of Dairy Technology*. Vol 63, 98-104.

SAOUDI Z., 2012. Caractérisation microbiologique de la protéolyse du fromage traditionnel algérien « Bouhezza » de ferme. *Thèse de magistère*. INATAA. Université Mentouri Constantine.90p.

SCHEMID R.D., 2005. Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique. Edition Flammarion. Paris, 335p.

SERHAN M., CAILLIEZ-GRIMAL C., BORGES F., REVOL-JUNELLES A.M., HOSRI C. and JACQUES FANNI J., 2009. Bacterial diversity of *Darfiyeh*, a lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 26 : 645-652.

SERHAN M., 2008. Valorisation durable des laits de chèvre de la région du Nord Liban. Transformation en fromage *Darfiyeh* et établissement de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques en vue de la création d'une appellation d'origine. *Thèse de Doctorat*. Institut National Polytechnique de Lorraine, 199p.

SKOOG D.A., HOLLER F.J. et NIEMAN T.A., 2003. Analyse de surface par spectroscopie et microscopie. Chapitre 21, *In Principe d'analyse instrumentale*. 1^{ère} édition. De Boeck. 968p.

SUGUNA L., RATHINASAMY V., LYAPPAN K., CHANDRABABU N.K. and MANDAL A.B., 2009. Alternatives to salt preservation: Preservation by Reducing Moisture Content. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution* Vol 6, Number4. Pp 119-122.

TANTAOUI-ELARAKI A., BERRADA M., EL MARRAKCHI A. et BERRAMOU A., 1983. Étude sur le Lben marocain. *Le lait*. 63 : 230-245.

TORKAR K.G. and VENGUST A., 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M-1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19, 570-577.

UNI EN ISO 6888-1, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). *Technique using Baird-Parker agar medium*.

UNI ISO 21528-2, 2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of enterobacteriaceae. Part 2 : Colony-count method.

VASQUEZ-BOLAND, J.A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZALEZ-ZORN, B., WEHLAND, J., KREFT, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 :584-640

VEISSYRE R., 1979. Technologie du lait, constitution, récolte, traitement et transformation du lait, 3^{eme} édition, la maison rustique, Paris.714p.

VIJAYALAKSHMI K., JUDITH. and RAJAKUMAR S., 2009. Novel plant based formulation for short term preservation of animal skins. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol 68 : 699-707.

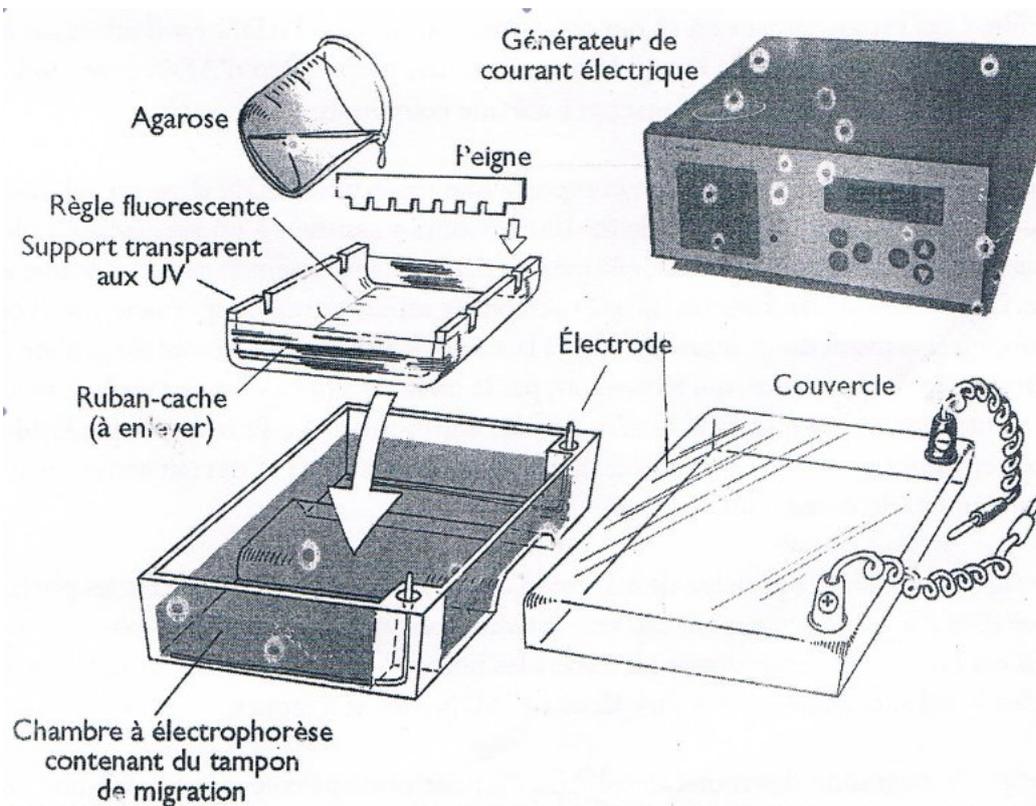
WALTHER B., SCHMID A., SIEBER R., WEHRMÜLLER K., 2008. Cheese in nutrition and health – review. *Dairy sci. Technol.* 88. 389-405

WOUTERS J.T., AYAD E.H.E., HUGENHOLTZ J., SMIT G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12 : 91-109

ZAIDI O., ZERTAL M. et ZIDOUNE M.N., 2000. Présentation d'un fromage traditionnel *Bouhezza*. *Journal Algérien de Médecine* .2 : 96-101.

ZAIDI O., 2002. Caractérisation du fromage traditionnel *Bouhezza* ; caractérisation physico-chimique et microbiologique. *Mémoire d'ingénieur*, Université Mentouri de Constantine, 51p.

Annexes



Annexe 1 : Exemple d'appareil de migration par électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose (BRODEUR et TOUSSAINT, 2007)

Annexe 2. Détection des bactéries pathogène par le système BAX[®]

1. Détection de *Salmonella* (validé par AFNOR)

a- Pré-enrichissement et enrichissement

Une quantité de 25ml d'échantillon de lait et/ou de *lben* est mise dans 225ml d'eau peptonée tamponnée (Oxoid, CM0509), supplémentée en novobiocine à 20mg/L (Oxoid, SR0181E) sont ajoutés et homogénéisés. Le bouillon obtenu est incubé pendant 20-24 heures à 42°C.

L'écouvillon avec le quel le biofilm de la peau de chèvre a été prélevé, est mis dans 10ml de milieu de pré-enrichissement (eau peptonée supplémentée en novobiocine à 20mg/L), l'ensemble est incubé dans les même conditions.

Après le pré-enrichissement, un volume de 10 µL de bouillon obtenu (lait, *lben* et biofilm) est alors transféré dans un tube eppendorf contenant 500µL de bouillon cœur-cerveille (Oxoid, CM0225) pour une deuxième incubation pendant 3 heures à 37°C, pour assurer un enrichissement en *Salmonella*.

b- Lyse des cellules et libération de L'ADN

Étiqueter et arranger le nombre de tubes eppendorf à utiliser (un tube pour chaque échantillon et un tube pour l'essai à blanc).

Pour la préparation du réactif de lyse, 150µL de protéase ont été additionnés à 12ml de tampon de lyse (kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C) sans oublier d'étiqueter la boîte avec la date de préparation.

Remarques : le réactif de lyse restera utilisable deux semaines au maximum s'il est stocké à 2-8°C. Nous pouvons préparer des petits volumes de réactif de lyse selon le besoin, en maintenant le rapport à 12,5µl protéase pour 1ml du tampon de lyse.

Un volume de 5µL de bouillon enrichi est ajouté à 200µL de réactif de lyse dans un tube eppendorf, puis deux incubations sont effectuées :

- une première incubation pendant 20 min à 37°C pour la dégradation des protéines cellulaires ;
- une deuxième incubation pendant 10 min à 95°C pour l'inactivation de la protéase.

Après la lyse, les tubes Eppendorf avec leur lysat sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C), le temps de préparer le transfert de lysat aux tubes PCR.

c- Amplification et détection

Un volume de 50µl de lysat est transféré dans un tube PCR contenant un comprimé des réactifs nécessaires à la PCR et à la réaction de fluorescence (Kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Salmonella*, Oxoid QB0608C). Après amplification le marqueur lié aux fragments d'ADN amplifié génère un signal fluorescent, qui est automatiquement détecté et analysé par le logiciel BAX[®] System Q7 (la détection se fait de la même manière pour les trois pathogènes).

2. Détection de *Listeria monocytogenes* (AOAC 2003, 12 cité dans AOAC, 2010)

a-Pré-enrichissement et enrichissement

Un volume de 25 ml d'échantillon de lait et/ou de *lben* est ajouté à 225ml de bouillon de tryptone soja et extrait de levure (LEEB, Oxoid CM0862), puis incubé pendant 22-24 heures à 30°C, afin de permettre le pré-enrichissement. Alors que l'écouvillon avec lequel le biofilm de la peau (avant et après contact avec) a été prélevé, a été pré-enrichie dans le même milieu de pré enrichissement et incubé dans les mêmes conditions.

Après incubation, un volume de 0,1ml du bouillon de pré enrichissement de chaque échantillon de lait, lben et biofilm est transféré dans 9,9mL du milieu MOPS-BLEB (Oxoid, CM1071B), et incubé pendant 18-24heures à 35°C, afin de réaliser l'enrichissement.

b- Lyse des cellules et libération de L'ADN

Un volume de 5µl de bouillon enrichi est ajouté à 200µL de réactif de lyse (Kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Listeria monocytogenes*, Oxoid QB069C) dans un tube Eppendorf, pour effectuer deux incubations :

- une première incubation pendant 60min à 55°C pour la dégradation des protéines cellulaires ;
- une deuxième incubation pendant 10min à 95°C pour l'inactivation de la protéase.

Après la lyse, les tubes eppendorf sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5 min (2-8°C).

C- Amplification et détection

Un volume de 50µl de lysat est transféré dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la PCR et à la réaction de fluorescence (Kit pour analyse de système BAX[®] automatisé, *Listeria monocytogenes*, Oxoid QB069C).

3. Détection de l'*Escherichia coli* O157 : H7**a- Enrichissement :**

Un volume de 25ml de lait et/ou de *Iben* est additionné à 225ml de bouillon tryptone soja modifié (Oxoid CM0989) supplémentée en novobiocine à 10mg/L (Oxoid SR0181E), l'ensemble est incubé pendant 18-24heures à 42°C. Alors que chaque écouvillon avec le quel le biofilm de chaque peau (avant et après contact avec) a été prélevé, a été enrichie dans le même milieu (10mL) et incubé dans les mêmes conditions.

b- Lyse des cellules et libération de L'ADN

Un volume de 5µl de bouillon de l'enrichissement est ajouté à 200µl de réactif de lyse (Kit d'analyse de système BAX[®] automatisé pour *Escherichia coli*O157 :H7, Oxoid QB0611C) dans un tube eppendorf, pour effectuer deux incubations :

- une première incubation pendant 20 min à 37°C ;
- une deuxième incubation pendant 10 min à 95°C ;

Après la lyse, les tubes eppendorf sont placés dans un bloc réfrigérant pendant 5min (2-8°C)

c- Amplification et détection

Un volume de 50µL de lysat est transféré dans un tube PCR contenant (sous forme de comprimé) tous les réactifs nécessaires à la PCR, et à la réaction de fluorescence (Kit pour analyse de système BAX[®] automatisé pour *Escherichia coli*O157 :H7, Oxoid QB0611C).

Les tubes préparés pour les trois pathogènes sont placés dans le thermocycleur du système BAX[®] et le programme d'amplification est lancé.

4. Expression des résultats

Les résultats sont présentés selon la présence ou l'absence des pathogènes (négative ou positive)

Annexe 3. Valeurs de pH et de température Durant la période d'acidification du lait

	Temps	pH mètre thermomètre 1		pH mètre thermomètre 2	
		Température	pH	Température	pH
30/05/'11	11:49:11	25,9	6,59	25,9	6,58
	12:09:11	25,8	6,57	25,7	6,57
	12:29:11	25,7	6,56	25,6	6,56
	12:49:11	25,6	6,55	25,5	6,55
	13:09:11	25,6	6,55	25,4	6,54
	13:29:11	25,5	6,54	25,3	6,53
	13:49:11	25,4	6,53	25,3	6,53
	14:09:11	25,2	6,52	25,2	6,52
	14:29:11	25,1	6,52	25,1	6,51
	14:49:11	25,1	6,51	25	6,5
	15:09:11	25	6,5	24,9	6,49
	15:29:11	24,9	6,49	24,8	6,49
	15:49:11	24,9	6,49	24,8	6,48
	16:09:11	24,8	6,48	24,7	6,47
	16:29:11	24,7	6,46	24,6	6,45
	16:49:11	24,7	6,43	24,6	6,41
	17:09:11	24,6	6,37	24,5	6,35
	17:29:11	24,5	6,3	24,4	6,28
	17:49:11	24,5	6,23	24,4	6,21
	18:09:11	24,4	6,16	24,3	6,14
	18:29:11	24,4	6,08	24,3	6,07
	18:49:11	24,4	6,01	24,2	6
	19:09:11	24,3	5,95	24,1	5,94
	19:29:11	24,3	5,89	24,1	5,88
	19:49:11	24,2	5,83	24	5,82
	20:09:11	24,1	5,77	24	5,77
	20:29:11	24,1	5,72	23,9	5,72
20:49:11	24	5,67	23,9	5,67	
21:09:11	24	5,62	23,8	5,62	
21:29:11	23,9	5,58	23,7	5,58	
21:49:11	23,8	5,54	23,7	5,54	
22:09:11	23,8	5,51	23,6	5,51	
22:29:11	23,7	5,47	23,6	5,47	
22:49:11	23,7	5,44	23,5	5,44	
23:09:11	23,6	5,42	23,5	5,41	
23:29:11	23,5	5,39	23,4	5,39	
23:49:11	23,5	5,37	23,4	5,36	
31/05/'11	00:09:11	23,4	5,34	23,3	5,34
	00:29:11	23,4	5,32	23,3	5,32

00:49:11	23,3	5,3	23,2	5,3
01:09:11	23,3	5,28	23,2	5,28
01:29:11	23,2	5,26	23,1	5,27
01:49:11	23,2	5,24	23,1	5,25
02:09:11	23,1	5,22	23	5,23
02:29:11	23,1	5,21	22,9	5,22
02:49:11	23	5,19	22,9	5,2
03:09:11	22,9	5,18	22,8	5,19
03:29:11	22,9	5,17	22,8	5,18
03:49:11	22,8	5,15	22,7	5,17
04:09:11	22,8	5,14	22,7	5,15
04:29:11	22,7	5,13	22,6	5,14
04:49:11	22,7	5,12	22,6	5,13
05:09:11	22,6	5,1	22,6	5,12
05:29:11	22,6	5,09	22,5	5,11
05:49:11	22,5	5,08	22,5	5,1
06:09:11	22,5	5,07	22,4	5,09
06:29:11	22,4	5,06	22,4	5,08
06:49:11	22,4	5,05	22,3	5,08
07:09:11	22,3	5,04	22,3	5,07
07:29:11	22,3	5,04	22,2	5,06
07:49:11	22,3	5,03	22,2	5,05
08:09:11	22,2	5,02	22,2	5,05
08:29:11	22,2	5,01	22,1	5,04
08:49:11	22,1	5	22,1	5,03
09:09:11	22,1	4,99	22	5,02
09:29:11	22,1	4,99	22	5,05
09:49:11	22	4,98	22	5,05
10:09:11	22	4,97	21,9	5,04
10:29:11	21,9	4,97	21,9	5,03
10:49:11	21,9	4,96	21,9	5,02
11:09:11	21,9	4,95	21,9	5,02
11:29:11	21,8	4,94	21,8	5,01

Annexe 4. Evolution de pH de *lben* au cours de son séjour dans les *chekouates*

		pH mètre thermomètre 1	pH mètre thermomètre2	moyenne ± écartype
Peau fraiche	<i>lben</i> après 30 min PF1	4,81	3,93	4,3375± 0,51
	<i>lben</i> après 30 min PF2	4,76	3,85	
	<i>lben</i> après 60 min PF1	4,82	3,83	4,305± 0,55
	<i>lben</i> après 60 min PF2	4,75	3,82	
	<i>lben</i> après 120 min PF1	4,79	4,08	4,4375± 0,38
	<i>lben</i> après 120 min PF2	4,74	4,14	
	<i>lben</i> final après 16 h PF1	4,67	4,67	4,6975± 0,05
	<i>lben</i> final après 16h PF2	4,67	4,78	
Peau sèche	<i>lben</i> après 30 min PS1	4,81	4,7	4,755± 0,06
	<i>lben</i> après 30 min PS2	4,81	4,7	
	<i>lben</i> après 60 min PS1	4,87	4,1	4,4725± 0,45
	<i>lben</i> après 60 min PS2	4,86	4,06	
	<i>lben</i> après 120 min PS1	4,86	4,06	4,525± 0,40
	<i>lben</i> après 120 min PS2	4,82	4,36	
	<i>lben</i> après 16h PS1	4,74	4,73	4,755± 0,03
	<i>lben</i> après 16h PS2	4,75	4,8	

Annexe 5. Evolution de l'acidité titrable du *Lben* au cours de son séjour dans les *chekouates*

	Acidité titrable (SH°)	moyenne±écartype
<i>lben</i> après 30 min PF1	34,05	34,98±1,32
<i>lben</i> après 30 min PF2	35,92	
<i>lben</i> après 60 min PF1	34,54	35,55±1,43
<i>lben</i> après 60 min PF2	36,57	
<i>lben</i> après 120 min PF1	35,68	35,23±0,63
<i>lben</i> après 120 min PF2	34,78	
<i>lben</i> final après 16 h PF1	41,37	42,63±1,78
<i>lben</i> final après 16h PF2	43,89	
<i>lben</i> après 30 min PS1	34,54	34,90±0,52
<i>lben</i> après 30 min PS2	35,27	
<i>lben</i> après 60 min PS1	34,54	34,98±0,62
<i>lben</i> après 60 min PS2	35,43	
<i>lben</i> après 120 min PS1	36,57	35,88±0,97
<i>lben</i> après 120 min PS2	35,19	
<i>lben</i> après 16h PS1	43,48	43,805±0,45
<i>lben</i> après 16h PS2	44,13	

Annexe 6. Caractéristiques microbiologiques des échantillons de *Iben* après contact avec les *chekouates* (UFC/ml)

	Lben	FTAM	Lactobacilles	lactocoques	levures
PF	30min	$1,4 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^5$
	60min	$4,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^5$
	120min	$2,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^8$	$7,6 \cdot 10^5$
	16h	$1,9 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^6$
PS	30min	$2,1 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^5$
	60min	$2,2 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^5$
	120min	$2,2 \cdot 10^8$	$5,9 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^5$
	16h	$1,5 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^6$

PF : peau fraîche ; PS : Peau sèche