

**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO**

INSTITUT DU DÉVELOPPEMENT RURAL



N° d'ordre

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE POLYTECHNIQUE
DE BOBO-DIOULASSO
(DOCTORAT UNIQUE)**

Doctorat Unique en Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Par

Bellancille MUSABYEMARIYA

**CONDITIONS DE PRODUCTION ET BIODIVERSITE
BACTERIENNE DES PRODUITS LAITIERS FERMENTES
ARTISANAUX DU SENEGAL**

Soutenue publiquement le 31 janvier 2011 devant

le jury composé de :

Président : Pr. Georges Anicet OUEDRAOGO, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Membres : Pr. Germain Jérôme SAWADOGO, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar EISMV de Dakar (Sénégal)

Pr. Malang SEYDI, EISMV de Dakar

Pr. Marina KOUSSEMON-CAMARA, Université d'Abobo-Adjamé (Côte d'Ivoire)

Pr. Bassirou Bonfoh, Centre Suisse de Côte d'Ivoire

À mes parents
À Maeva & Christian
À mes frères et sœurs
A mes amis & collègues

Remerciements

Je tiens, en premier lieu, à saluer l'aimable contribution de l'ensemble des membres du jury.

Cette thèse m'a permis de connaître et de travailler avec des personnes exceptionnelles et si elle existe aujourd'hui, c'est aussi un peu grâce :

A Madame le Docteur Agnès Delacroix-Buchet, qui m'a accueillie à trois reprises dans son équipe de recherche « écosystèmes bactériens laitiers » à l'Unité Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes de l'INRA à Jouy en Josas (France). Je ne saurais la remercier assez pour son encadrement, sa disponibilité, son attention et ses conseils. Qu'elle trouve dans ces quelques lignes l'expression de mon incommensurable gratitude.

A tous les membres de l'équipe « écosystèmes bactériens laitiers » Marina, Isabelle, Claire, Manon et Pascal. Merci pour votre assistance et amitié. Je n'oublierai pas de sitôt les jours passés à Jouy-en Josas à vos côtés et surtout les « pots » d'au revoir à chaque fois que je devais rentrer au Sénégal. Un clin d'œil à Virginie, Emilie et Patrick.

A Madame le Professeur Marina KOUSSEMON-CAMARA enseignant-chercheur à l'UFR des Sciences et Technologies des Aliments de l'université d'Abobo-Adjamé, qui a eu la gentillesse d'accepter de co-encadrer cette thèse dans des conditions un peu particulières. Je lui témoigne toute ma gratitude

A Monsieur le Professeur Malang SEYDI, enseignant-chercheur à l'Ecole Inter-Etats de Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar. Merci pour vos conseils et votre soutien dans ma vie professionnelle en général et tout au long de ce travail de thèse en particulier.

A Monsieur le Professeur Louis Joseph PANGUI, Directeur Général de l'EISMV de Dakar. Merci pour la confiance que vous accordez à vos « jeunes » collègues.

A Monsieur le Professeur Germain Jérôme SAWADOGO, Coordonnateur de la formation post-universitaire. Merci pour votre sollicitude et votre implication dans la promotion des « jeunes enseignants » de l'EISMV.

A Monsieur le Professeur Serge Bakou. Un grand merci pour votre disponibilité, vos conseils, votre encouragement et votre aide dans les démarches administratives relatives à mon inscription à l'Université d'Abobo-Adjamé.

A tous mes collègues et amis de l'EISMV et du Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDAOA).

A tous les producteurs et transformateurs laitiers du Sénégal qui ont bien voulu m'accueillir chez eux et sacrifier quelques volumes de lait pour mes manipulations.

Enfin ce travail n'aurait pas abouti sans le soutien financier de l'Agence Universitaire de la Francophonie. Qu'elle trouve ici, l'expression de mes sincères remerciements et de ma profonde reconnaissance. Un clin d'œil à Mesdames Fabar Sané et Matel Wane-Kane de l'AUF-Bureau Afrique de l'Ouest (Dakar/Sénégal).

Table des matières

Remerciements

Résumés en français et en anglais

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

- | | | |
|----|------------------------------------|---|
| 1. | Problématique | 1 |
| 2. | Hypothèses de recherche | 4 |
| 3. | Question et objectifs de recherche | 4 |

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.	Composition chimique et intérêt nutritionnel du lait	6
1.	Composition globale	6
2.	Matière azotée du lait	6
3.	Matière grasse du lait	8
4.	Glucides du lait	9
5.	Minéraux et vitamines du lait	10
II.	Microorganismes du lait et des produits laitiers fermentés	12
1.	Bactéries	12
1.1.	Bactéries d'intérêt technologique	12
1.1.1.	Bactéries lactiques	12
1.1.2.	Bactéries non lactiques d'intérêt technologique	16
1.2.	Bactéries d'altération et/ou potentiellement pathogènes	17
1.2.1.	Bactéries psychrotrophes	17
1.2.2.	Staphylocoques à coagulase positive	17
1.2.3.	Entérobactéries	18
1.2.4.	Bactéries sporulées	18
2.	Champignons : levures et moisissures	18
3.	Facteurs de variation de la composition microbienne des laits	19
3.1.	Variations saisonnières	19
3.2.	Variations en fonction des pratiques d'élevage	19
III.	Produits laitiers fermentés	21
1.	Phénomène de la coagulation du lait	22
1.1.	Coagulation acide	22
1.2.	Coagulation enzymatique	23
2.	Technologie de fabrication des produits laitiers fermentés	24
2.1.	Yaourt	24

2.2.	Autres laits fermentés	25
2.3.	Fromages à pâte molle	27
3.	Rôle des bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés	29
3.1.	Production d'arômes	29
3.2.	Préservation de la qualité sanitaire	29
3.3.	Allégations santé sur les bactéries lactiques	30
IV.	Filière laitière traditionnelle au Sénégal	32
1.	Approvisionnement en lait : production locale et importations	33
2.	Elevage au Sénégal	33
2.1.	Troupeaux et potentiel laitier	35
2.2.	Systèmes de production	36
3.	Filière lait locale et produits laitiers fermentés	36
4.	Contraintes au développement de la filière locale	35
5.	Opportunités du développement de la filière locale	35
V.	Identification des microorganismes du lait	38
1.	Taxonomie bactérienne	38
1.1.	Taxonomie phénotypique	39
1.2.	Taxonomie moléculaire ou génotypique	39
1.2.1.	Détermination du pourcentage guanine + cytosine (% G+C)	39
1.2.2.	Hybridation ADN/ADN	39
1.2.3.	Autres techniques basées sur la PCR	40
1.2.3.1.	PCR comme base des méthodes moléculaires	40
1.2.3.2.	Analyse de séquences ou séquençage	42
1.2.3.3.	Techniques reposant sur l'emploi d'enzymes	42
2.	Etude des micro-organismes du lait et des produits laitiers	43
2.1.	Méthodes traditionnelles	43
2.2.	Nouvelles approches moléculaires	44
2.2.1.	Identification globale des espèces présentes	44
2.2.1.1.	Analyse de fragments : la SSCP	44
2.2.1.2.	T-RFLP	45
2.2.1.3.	Electrophorèses en conditions dénaturantes	46
2.2.2.	Détection des espèces particulières dans une matrice laitière	46
2.2.2.1	Hybridation <i>in situ</i> ou méthode FISH	46
2.2.2.2	Hybridation sur membrane	47
2.2.2.3	PCR spécifiques	47
 CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES		
I.	Etude des conditions de production des laits et produits laitiers	49
1.	Choix des exploitations suivies	49
2.	Conduite des enquêtes	50

II.	Recherche/dénombrement des flores par les méthodes culturales	52
1.	Matériel biologique	52
2.	Méthodes	52
2.1.	Echantillonnage	52
2.1.1.	Echantillons de lait cru de vache	52
2.1.2.	Echantillons de laits fermentés de vache	53
2.1.3.	Echantillons de lait cru et de lait thermisé de chèvre	53
2.1.4.	Echantillons de fromage de chèvre	53
2.2.	Dénombrement des bactéries lactiques	54
2.3.	Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile	54
2.4.	Dénombrement d' <i>Escherichia coli</i>	54
2.5.	Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive	55
2.6.	Recherche des salmonelles	55
2.7.	Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	56
III.	Etude de la biodiversité bactérienne des laits et fromages analysés par les méthodes moléculaires	57
1.	Matériel biologique	57
1.1.	Echantillons de lait cru et fermenté de vache	57
1.2.	Echantillons de lait cru et de fromage de chèvre	58
1.3.	Souches de référence	58
2.	Méthodes	58
2.1.	Extraction de l'ADN génomique	58
2.2.	Amplification par PCR des extraits d'ADN	60
2.3.	Vérification des produits PCR par électrophorèse en gel d'agarose	62
2.4.	Séparation des produits PCR par la TTGE et la DGGE	63
2.4.1.	Séparation des produits PCR par la TTGE	64
2.4.2.	Séparation des produits PCR par la DGGE	65
2.5.	Assignment des bandes aux empreintes de la base des données	66
2.6.	Identification des espèces non répertoriées dans la base des données	67
2.7.	Identification des espèces sous-dominantes par les PCR spécifiques	67
IV.	Caractérisation physico-chimique des échantillons de lait et de fromages	
1.	Matériel biologique	69
1.1.	Echantillons de laits crus et fermentés de vache	69
1.2.	Echantillons de laits crus et fromage de chèvre	69
2.	Méthodes	69
2.1.	Détermination de l'acidité titrable	69
2.2.	Dosage de la teneur en protéines totales	70
2.3.	Dosage de la teneur en matière grasse	71
2.4.	Dosage de la teneur en eau	71
2.5.	Dosage de la teneur en chlorure de sodium	71
V.	Traitement statistique des données	72

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Conditions de production des laits et produits laitiers fermentés artisanaux	
1. Résultats	73
1.1. Caractéristiques des exploitations bovines suivies	73
1.2. Caractéristiques des exploitations caprines suivies	76
1.3. Typologies de la fermentation du lait	77
1.3.1. Transformation du lait cru de vache en lait fermenté	77
1.3.2. Transformation du lait de chèvre en fromage	80
2. Discussion	84
2.1. Conditions de production des laits crus et fermentés de vache	84
2.2. Conditions de production des laits crus et fromages de chèvre	87
3. Conclusion partielle	87
II. Etude de la microflore des échantillons par les méthodes phénotypiques	
1. Résultats	89
1.1. Microflore des laits crus de vache	89
1.2. Microflore des laits fermentés de vache	90
1.3. Microflore des laits crus et fromages de chèvre	92
2. Discussion	94
2.1. Microflore lactique des laits crus de vache	94
2.2. Microflore lactique des laits fermentés de vache	96
2.3. Microflore lactique de laits et fromages de chèvre	96
3. Microflore potentiellement pathogène ou d'altération	99
4. Conclusion partielle	102
III. Etude de la microflore des échantillons analysés par les méthodes moléculaires	
1. Résultats	104
1.1. Microflore des laits crus de vache	105
1.2. Microflore des laits fermentés de vache	107
1.3. Microflore des laits crus et fromages de chèvre	109
1.4. Détermination des espèces minoritaires par des PCR spécifiques	111
2. Discussion	111
3. Conclusion partielle	116
IV. Caractéristiques physico-chimiques des laits et fromages étudiés	
1. Résultats	118
1.1. Acidité titrable	118
1.2. Teneur en matière utiles dans les laits frais et fermentés de vache	119
1.3. Teneur en chlorure de sodium et en eau dans les fromages	120
2. Discussion	121
3. Conclusion partielle	123

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I.	Conclusion générale	125
II.	Perspectives	129

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
-----------------------------	-----

VALORISATION DU TRAVAIL DE THÈSE	148
----------------------------------	-----

ANNEXES

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique	Lc. : <i>Lactococcus</i>
A : adénine	LDL : low-density lipoprotein
AFLP : Amplification Fragment Length Polymorphism	Ln. : <i>Leuconostoc</i>
ARN : acide ribonucléique	Leu : leucine
ARNr (ou ADNr) : Acide (désoxy) ribonucléique ribosomal	MG : matière grasse
ATP : adénosine triphosphate	mM : millimole par litre
Aw : activity of water (activité de l'eau)	MRS : De Man, Rogosa and Sharpe
BL : bactérie lactique	°C : degré celsius
C. : <i>Carnobacterium</i>	P. : <i>Pediococcus</i>
CNRZ : Centre National de Recherche Zootechnique	pb : paire de bases
C : cytosine	PCA : Plate Count Agar
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
dNTP : désoxyribonucléoside 5'-triphosphate	pH : potentiel d'hydrogène
EDTA : éthylène diamine tétraacétate de sodium	PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
FAO : Food and Agriculture Organization	p/v : rapport poids à volume
FIL : Fédération Internationale de Laiterie	RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization	RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
g, mg, µg, ng : gramme, milligramme, microgramme, nanogramme	S. : <i>Staphylococcus</i>
G : guanine	SDS : dodécyl sulfate de sodium
GRAS : Generally Regarded As Safe	SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism
HDL : high-density lipoprotein	Str. : <i>Streptococcus</i>
kb : kilobase	T. : <i>Tetragenococcus</i>
ILSI : International Life Science Institute	T : thymine
ISO : International Organization of Standardization	TES : Tris EDTA Saccharose
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre	Tm : températures de demi dénaturation
Lb. : <i>Lactobacillus</i>	

TTGE : Temporal Temperature Gradient
Electrophoresis

Tris : Tris-hydroxyméthylaminométhane

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length

UFC : Unité Formant Colonies

V : volt

v/v : rapport volume à volume

W : watt

Liste des tableaux

Tableau I : Composition globale du lait de vache	6
Tableau II : Effets bénéfiques des constituants protéiques et peptidiques du lait sur la santé	7
Tableau III : Teneur du lait de vache en différents nutriments et leurs effets bénéfiques sur la santé	11
Tableau IV : Quelques utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentation	16
Tableau V : Origine de différentes enzymes utilisées pour la coagulation du lait	23
Tableau VI : Quelques exemples de laits fermentés et leurs caractéristiques	27
Tableau VII : Evolution du disponible en lait au Sénégal de 2000 à 2006	32
Tableau VIII : Amorces utilisées pour la Nested-PCR	62
Tableau IX : Préparation des solutions de gel DGGE	65
Tableau X : Amorces utilisées pour les PCR spécifiques d'espèces	68
Tableau XI : Caractéristiques des exploitations bovines suivies	74
Tableau XII : Procédés de fabrication des fromages dans les deux fromageries suivies	82
Tableau XIII : Résultats des dénombrements des bactéries lactiques dans les échantillons des laits crus de vache	89
Tableau XIV : Teneurs moyennes en flores d'altérations ou potentiellement pathogènes dans les laits crus	90
Tableau XV : Résultat des dénombrements des bactéries lactiques dans les échantillons de lait fermenté de vache	91
Tableau XVI : Teneurs moyennes en flore d'altération ou potentiellement pathogène dans les laits fermentés	92
Tableau XVII : Moyenne des numérations en différents groupes bactériens dans les échantillons de lait et fromages de chèvre	92
Tableau XVIII : Moyenne des numérations en \log_{10} ufc/mL ou par g des populations bactériennes dans les échantillons de laits et fromages issus de deux ateliers	93
Tableau XIX : Moyenne des numérations des différents groupes bactériens dans les échantillons de l'atelier A	94
Tableau XX : Moyennes des numérations des différents groupes bactériens des échantillons de l'atelier B	94
Tableau XXI : Teneur moyenne en matières utiles dans les laits crus de vache	119
Tableau XXII : Teneur moyenne en matières utiles dans les laits fermentés de vache	119
Tableau XXIII : Teneur en protéines totales et en matière grasse dans les laits et fromages de chèvre	120
Tableau XXIV : Teneur en chlorure de sodium dans les fromages étudiés	120

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques avec leur distance basée sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S	13
Figure 2 : Diagramme de fabrication du yaourt	25
Figure 3 : Carte des zones éco-géographiques du Sénégal	34
Figure 4 : Différentes étapes d'une réaction de PCR classique	41
Figure 5 : Représentation schématique de la méthodologie d'approche utilisée	48
Figure 6 : Carte du Sénégal indiquant la situation géographique des exploitations et ateliers fermiers suivis dans cette étude	50
Figure 7 : Schéma d'extraction des ADN totaux par le procédé FTA	60
Figure 8 : Système « Dcode Universal Mutation Detection System » de Biorad utilisé pour la TTGE et la DGGE	63
Figure 9 : Illustration d'une traite mécanique	75
Figure 10 : Illustration d'une traite manuelle	75
Figure 11 : Calebasse en bois utilisée pour la fermentation du lait	78
Figure 12 : Calebasse en « fruit » pour la fermentation du lait	78
Figure 13 : Cuillère en « végétal » utilisée pour la mesure du lait	78
Figure 14 : Outre en peau de mouton pour la fermentation et le barattage du lait	78
Figure 15 : Calebasse en bois pour la vente du lait	79
Figure 16 : Calebasse en bois pour la fermentation du lait	79
Figure 17 : Diagramme de fabrication des laits fermentés traditionnels	80
Figure 18 : Filtration du lait à la réception (fromagerie A)	83
Figure 19 : Fleurage du caillé (Fromagerie A)	83
Figure 20 : Moulage et égouttage des fromages (fromagerie A)	83
Figure 21 : Moulage et égouttage des fromages (fromagerie B)	83
Figure 22 : Fromages en cours d'affinage (fromagerie A)	83
Figure 23 : Fromages en fin d'affinage (fromagerie A)	83
Figure 24 : Profils TTGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de laits crus de vache	105
Figure 25 : Profils DGGE (espèces haut %GC) des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de lait cru de vache	106
Figure 26 : Profils TTGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de laits fermentés de vache	107
Figure 27 : Profils DGGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de laits fermentés de vache	108

Figure 28 : Profils TTGE des ampliâts V3 de l'ADNr 16S des échantillons de laits crus et fromages de chèvre	109
Figure 29 : Profils DGGE des amplicons V3 de l'ADNr 16S des échantillons de laits crus et fromages de chèvre	110
Figure 30 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR d'extraits d'ADNr présumés <i>E.coli</i>	111
Figure 31 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR d'extraits d'ADNr présumés <i>E.coli</i>	112
Figure 32 : Acidité moyenne des échantillons de laits fermentés produits dans les douze exploitations fermières suivies	118

Résumé

Titre : Conditions de production et biodiversité bactérienne des produits laitiers fermentés traditionnels du Sénégal

Au Sénégal, le lait cru de vache ou de chèvre est utilisé dans la fabrication de produits laitiers artisanaux, notamment les laits fermentés (à base de lait de vache) et les fromages de chèvre. Dans les procédés de fabrication de ces produits, la fermentation est tributaire de la microflore indigène présente dans le lait et dans les ateliers de fermentation. Notre travail décrit les conditions de production des laits crus et des produits laitiers fermentés issus de ces laits et dresse un inventaire des populations bactériennes présentes dans tous ces produits. Les enquêtes de terrain et les prélèvements d'échantillons ont été effectués dans 12 exploitations bovines appartenant aux 3 systèmes d'élevage (intensif, semi-intensif et extensif) habituellement décrits au Sénégal et dans 2 fromageries artisanales.

Ces enquêtes ont montré que l'hygiène dans les étables et au cours de la traite diminue au fur et à mesure qu'on s'éloignait du système de production intensif. De façon générale, que ce soit pour l'obtention de lait fermenté ou de fromage, la fermentation du lait se faisait à la ferme sans ajout de levains industriels (sauf pour la fromagerie A). Les schémas de fabrications n'étaient pas non plus standardisés. Les dénombrements de la microflore lactique ont montré que les lactocoques et les lactobacilles mésophiles codominaient dans tous les produits analysés, et que les lactobacilles mésophiles et thermophiles coexistaient. Les numérations moyennes en lactobacilles mésophiles étaient de $2,86 \cdot 10^5$ ufc/mL de lait cru de vache et de $1,37 \cdot 10^7$ ufc/mL de celui de chèvre. Dans les laits fermentés et dans les fromages, ils atteignaient respectivement $2,17 \cdot 10^7$ ufc/mL et $2,86 \cdot 10^8$ ufc/g. La population des lactocoques était évaluée à hauteur de $5,35 \cdot 10^5$ ufc/mL de lait cru de vache, $1,14 \cdot 10^8$ ufc/mL de celui de chèvre, $2,20 \cdot 10^8$ ufc/mL de lait fermenté de vache et $1,84 \cdot 10^8$ ufc/g de fromage de chèvre. Sur le plan moléculaire, plusieurs espèces de bactéries appartenant aux genres *Lactococcus* (*Lc. lactis*, *Lc. garvieae*), *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. brevis/jonhsoni*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. gasseri*), *Streptococcus* (*Str. thermophilus*, *Str. caseolyticus*) et *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides*, *Ln. citreum*) ont été identifiées dans les échantillons. D'autres espèces de bactéries non lactiques mais d'intérêt technologique comme les staphylocoques à coagulase négative et les bactéries corynéiformes étaient également présentes. Cette flore d'intérêt coexistait malheureusement avec des germes potentiellement pathogènes tels qu'*Escherichia coli*. Les résultats obtenus indiquent également que dans les conditions locales de production, le lait de chèvre a de meilleures aptitudes fromagères et nutritionnelles que le lait de vache. Dans le lait de chèvre, la teneur moyenne en protéines totales a été de 42,2 g/L contre 36 g/L, pour le lait celle de la matière grasse était de 51,6 g/L contre 38 g/L. Les fromages issus de lait de chèvre contenaient 19,2 % de protéines et 19,4 % de matière grasse (fromagerie A), 12,96 % de protéines et 11,25 % de matière grasse (fromage B). Dans les laits fermentés, la teneur moyenne en protéines totales était de 38 g/L celle de la matière grasse de 42 g/L.

Mots clés : Lait, Sénégal, lait fermenté, fromage, bactéries lactiques, protéines, matière grasse.

Summary

Title: Conditions of production and bacterial biodiversity of fermented traditional dairy products from Senegal

In Senegal, raw cow or goat milk is used in the manufacturing of the dairy products, in particular fermented cow milks and goat's cheeses. In these processes, fermentation is dependent on the indigenous microflora present in the milk and in the fermentation compartments (of the animals). Our work describes the conditions of production of raw milks and draws up an inventory of the bacterial populations present in raw milks and their fermentation products. Field investigations and samplings were carried out in 12 bovine farms belonging to the 3 breeding systems (intensive, semi-intensive and extensive) usually described in Senegal and in 2 traditional goat's milk cheese factories.

The farm investigations showed that hygiene in the cattle sheds and during the milking decreases as one moves away from the intensive system of production. The fermentation of milk was done on the farm without industrial starter addition (except for the cheese factory A). Process flow diagrams were not standardized either. The lactic microflora count showed that the *Lactococci* and mesophilic *Lactobacilli* shared equal domination just as mesophilic and thermophilic *Lactobacilli* coexisted in all the samples. The average count in mesophilic *Lactobacilli* was $2.86 \cdot 10^5$ ufc/mL in raw cow milk, $1.37 \cdot 10^7$ ufc/mL in raw goat's milk. In fermented milks and cheeses, they respectively reached $2.17 \cdot 10^7$ ufc/mL and $2.86 \cdot 10^8$ ufc/g. The *Lactococci* count was of the order of $5.35 \cdot 10^5$ ufc/mL in raw cow milk, $1.14 \cdot 10^8$ ufc/mL in raw goat's milk, $2.20 \cdot 10^8$ ufc/mL in fermented cow milk and $1.84 \cdot 10^8$ ufc/g in goat's cheese. The content and the diversity of lactic microflora of the samples analyzed were confirmed by molecular biology techniques and tools. Several species of bacteria belonging to the genus *Lactococcus* (*Lc. lactis*, *Lc. garvieae*), *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. brevis/jonhsoni*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. gasseri*), *Streptococcus* (*Str. thermophilus*, *Str. caseolyticus*) *Leuconostoc* (*Ln. mesenteroides*, *Ln. citreum*) were identified in the samples. Other non-lactic species but of technological interest like the negative coagulase *Staphylococci* and *Coryneforme* bacteria were also present. This flora of interest unfortunately coexists with potentially pathogenic germs such as *E.coli* which was highlighted in certain samples. From the data that was obtained, it also arises that under local conditions of production, goat's milk has better cheese-making and had better nutritional aptitudes than cow milk. The average total protein content was 42.2 g/L (goat) compared to 36 g/L (cow), the fat content was 51.6 g/L (goat) compared to 38 g/L (cow). Cheeses from goat's milk contained 19.2% proteins and 19.4% fat content (cheese factory A), 12.96% proteins and 11.25% fat content (cheese B). In fermented milks, the average total protein content was 38 g/L that of the fat content was 42 g/L.

Key words: Lactic bacteria, proteins, fat content, raw cow milk, raw goat's milk, fermented milk, cheese, Senegal

INTRODUCTION GENERALE

1. Problématique

Depuis fort longtemps, l'élevage a eu un poids important dans l'économie sénégalaise où le sous-secteur élevage constitue la deuxième grande activité du secteur primaire après l'agriculture. En 2007, le cheptel sénégalais a été estimé à 3,2 millions de bovins, 5,1 millions d'ovins, 4,3 millions de caprins, 0,5 millions d'équins, 4600 camelins et 0,3 millions de porcins (**Anonyme 1, 2007**). Si d'un point de vue économique, chaque spéculation apporte sa pierre à l'édifice, il faut reconnaître qu'au Sénégal, l'élevage bovin est le plus important en termes de ressources générées, des investissements qu'il reçoit de la part des pouvoirs publics, sans oublier les préférences des éleveurs et des consommateurs.

Les 3,2 millions de bovins exploités au Sénégal sont dans des systèmes de production mixte (viande et lait) mais avec des élevages orientés davantage vers la production laitière. Ce cheptel est réparti dans trois systèmes d'élevage : le système pastoral de type extensif, le système agro-pastoral ou semi-intensif et le système intensif. Le système extensif regroupe près de 30% du cheptel bovin et est présent au nord et au centre-nord du pays. Le système extensif exploite les races autochtones à faible potentiel laitier. La rareté des ressources alimentaires et l'insuffisance de la couverture sanitaire des animaux demeurent des contraintes à la production du lait dans ce système (**Duteurtre et al., 2010**). Le système agro-pastoral est retrouvé au centre et dans le sud du pays. Il exploite les races locales essentiellement mais on note, depuis les années 1995, les essais d'introduction d'animaux exotiques, en croisement pour améliorer la production laitière. Enfin, le système intensif se retrouve principalement à la périphérie de la région de Dakar, dans la zone des Niayes où le climat est propice à l'élevage des races exotiques à haut potentiel laitier.

Au Sénégal, malgré une longue tradition laitière et des atouts majeurs du lait pour la sécurité alimentaire : source de protéines animales et source de revenus réguliers, grande implication des femmes dans la gestion et la distribution du lait (**Musabyemariya, 1997**), la collecte et la transformation du lait sont restées très artisanales. Le lait étant une denrée très périssable, après la traite, en absence de moyens de conservation classiques tels la chaleur ou le froid, les producteurs locaux n'ont recours qu'à la fermentation suivie ou pas d'une déshydratation partielle pour une conservation à très court terme. Selon les estimations, en Afrique occidentale et orientale, 71% de la production du lait sont transformés en lait fermenté (**Duteurtre, 2003**).

Au Sénégal, le lait fermenté de vache appelé communément “lait caillé” est pratiquement la seule forme de valorisation du lait de vache produit localement. Pour l’année 2008, cette production a été estimée à plus de 120 millions de litres (**Anonyme 2, 2009**). Le lait caillé fait partie des aliments de base. Il est très populaire grâce à son goût agréable mais aussi grâce à l’élargissement de l’offre par l’ajout d’autres aliments, tels que les céréales. Couplé à l’eau et sucré, le lait devient une boisson très rafraichissante.

La fermentation des aliments est un phénomène essentiellement microbien. Lors de la fabrication industrielle des produits laitiers fermentés, la matière première subit au préalable un traitement d’assainissement pour détruire la flore indigène du lait, avant d’êtreensemencé par un cocktail de bactéries appelé communément « ferment » ou levain. Dans le cas des procédés traditionnels sans ensemencement préalable, le processus de la fermentation est assuré par les microflores apportées par le lait cru matière première ou par l’environnement de la traite et de la transformation du lait.

Le lait cru est susceptible de contenir une flore microbienne diverse et variée. Plus de 150 espèces microbiennes ont été répertoriées dans des laits crus, chaque lait ayant son propre équilibre en terme d’espèces et de souches (**Callon et al., 2007, Delbès et al., 2007**). La flore naturelle ou indigène du lait inclut aussi bien celle d’intérêt technologique que celle potentiellement pathogène pour l’homme tels que *Escherichia coli* entéropathogène, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella sp* (**Latorre et al., 2009 ; Oliver et al., 2005 ; Schoder et al., 2003**).

En technologie laitière, la flore d’intérêt est constituée essentiellement de bactéries lactiques. Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d’espèces très hétérogène dont le point commun est la production d’acide lactique à partir de différents sucres, notamment le lactose, qui est le sucre spécifique du lait (**Dellaglio et al., 1994**). Les bactéries lactiques définissent en grande partie les caractéristiques sensorielles des produits laitiers fermentés. De nombreuses études prouvent que les produits laitiers fermentés au lait cru ont des saveurs plus marquées et plus typiques que ceux fabriqués au lait pasteurisé ou micro-filtré (**Callon et al., 2005 ; Coulon et al., 2005 ; McSweeney et al., 1993**).

L'importance des bactéries lactiques ne se limite pas que dans la fabrication des aliments fermentés. De part leur capacité à s'implanter dans le tractus digestif, elles sont susceptibles de modifier la flore intestinale de l'hôte, en particulier de diminuer la quantité de germes indésirables (Adams *et al.*, 1988 ; Arvola *et al.*, 1999 ; Beausoleil *et al.*, 2007 ; Benkerroum *et al.*, 2002 ; Holzapfel *et al.*, 1995 ; Leplingard *et al.*, 2006 ; Lewis *et al.*, 2009 ; Tuohy *et al.*, 2007). D'autres effets bénéfiques tels que la diminution du cholestérol sanguin et le renforcement du système immunitaire ont été également attribués aux bactéries lactiques (Drouault et Corthier, 2001 ; Loones, 1994). Dans les matrices alimentaires, certaines souches de bactéries lactiques produisent des substances ou composés organiques qui constituent une barrière vis-à-vis des espèces pathogènes (Adams *et al.*, 1995 ; Batdorj *et al.*, 2007 ; Benkerroum *et al.*, 2002 ; Caplice, 1999).

Au Sénégal, malgré l'importance de la microflore du lait en santé publique et en industrie agro-alimentaire, peu d'informations existe sur les flores microbiennes des produits laitiers artisanaux et traditionnels. Les rares travaux disponibles n'ont concerné que la flore totale et d'altération. De plus, ces études ont été basées sur les méthodes phénotypiques avec des étapes préalables d'isolement et de culture des microorganismes (Minla'a *et al.*, 2001 ; Seydi, 1993). Même si ces méthodes dites « culturo-dépendantes » demeurent d'actualité, leurs limites ont été largement documentées. Parmi ces limites, on peut citer la non-cultivabilité ou la perte de cultivabilité de certaines souches, la sélectivité des milieux de culture, la méconnaissance *a priori* de toute la microflore et *a fortiori* le moyen de cultiver toutes ses espèces (Amann *et al.*, 1995 ; Masco *et al.*, 2005). La conséquence de cet état de fait serait une sous estimation de la diversité microbienne des produits laitiers produits localement au Sénégal. Les différents auteurs n'ont pas cherché non plus à relier la flore des laits avec les conditions de production alors qu'il a été démontré que la composition microbiologique des laits varie selon les pratiques des producteurs (Callon *et al.*, 2007 ; Michel *et al.*, 2001).

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail de recherche dont le but est de contribuer à l'amélioration des méthodes traditionnelles de fermentation. A terme, les résultats de cette recherche pourront servir dans l'amélioration des méthodes traditionnelles de fermentation, de même qu'ils pourraient ouvrir des perspectives d'utilisation des souches de bactéries lactiques « locales » dans le domaine de la santé, de la nutrition ou de la bio-conservation.

2. Hypothèses de recherche

Les hypothèses que cherche à confirmer ou infirmer ce travail de recherche sont articulées au tour de trois points suivants :

- ✓ Les microflores lactiques qui confèrent aux laits fermentés et fromages artisanaux sénégalais des propriétés organoleptiques bien spécifiques et appréciées des consommateurs, sont originelles et peuvent varier d'un terroir à un autre, d'un système d'élevage à un autre. Elles peuvent également être isolées dans des laits ou fromages n'ayant subi aucun traitement thermique puis identifiées.
- ✓ La caractérisation qualitative de ces microflores lactiques permet de connaître le profil microbien des laits fermentés et fromages artisanaux sénégalais et d'en déduire leurs caractéristiques. Sur place et à l'échelle du paysan, certaines des souches isolées localement pourraient avoir des utilisations potentielles dans l'amélioration des technologies traditionnelles de fermentation.
- ✓ A l'échelle industrielle, les souches de bactéries lactiques autochtones pourraient avoir des applications dans le domaine de la santé, de la nutrition et de la bioconservation.

De ces hypothèses, découlent la question et les objectifs de recherche.

3. Question et objectifs de recherche

La question de recherche qui a été le fil conducteur de cette thèse était « quelles sont les populations microbiennes présentes dans les laits et produits laitiers fermentés sénégalais ? Y-a-il une variation de ces dernières en fonction des systèmes d'élevage ? ». Cette question de recherche a été associée à un objectif général qui était d'estimer la diversité bactérienne des laits et produits laitiers fermentés produits au Sénégal en relation avec les pratiques d'élevage et les procédés de fermentation artisanale ou traditionnelle du lait au Sénégal. Les objectifs spécifiques de ce travail étaient de :

- ✓ Décrire les pratiques d'élevage, des pratiques autour de la traite et de la fermentation du lait au Sénégal ;

- ✓ Faire la caractérisation physico-chimique et microbiologique des laits crus de chèvre et de vache ainsi que de leurs produits de fermentation (lait fermenté de vache et fromages de chèvre) ;
- ✓ Dégager les liens entre les paramètres analytiques et les pratiques des éleveurs et transformateurs laitiers.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. COMPOSITION CHIMIQUE ET INTERET NUTRITIONNEL DU LAIT

Le *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 206-1999) définit le lait comme étant « la sécrétion mammaire normale » d'animaux de traite, obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans aucune addition ou soustraction, destinée à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur ». Plusieurs espèces animales (vache, brebis, chèvre, chamelle, bufflesse) fournissent du lait destiné à la consommation humaine, mais le lait de vache est le plus commun, en terme de quantité et de disponibilité. Sur le plan physico-chimique, le lait est une émulsion de matière grasse, sous forme globulaire, dans un liquide qui présente des analogies avec le plasma sanguin. Ce liquide est lui-même une suspension de matières protéiques dans un sérum. Ce dernier est une solution neutre contenant principalement du lactose et des sels minéraux.

1. Composition globale du lait de vache

La composition globale du lait de vache est donnée dans le tableau I.

Tableau I : Composition globale du lait de vache (Amiot *et al.*, 2002)

Constituants	Valeurs moyennes (%)	Variations limites (%)
Eau	87,5	85,5-89,5
Glucides	4,6	3,6-5,5
Matière grasses	3,7	2,4-5,5
Protéines	3,2	2,9-5,0
Minéraux	0,8	0,7-0,9
Constituants mineurs : pigment (β carotène), enzymes (lipase, phosphatase, protéase, lactoperoxydase), vitamines (A, D, B), gaz dissous (gaz carbonique, oxygène, azote)		

2. Matière azotée du lait

Au moment de la traite, le lait de vache contient en moyenne 32 g/L de matière azotée. Cette dernière est constituée d'une fraction essentiellement protéique (95%), le reste étant composé d'urée, de créatine, de créatinine, d'ammoniaque, d'acides aminés libres, de vitamines et de nucléotides (Amiot *et al.*, 2002).

Les protéines du lait se répartissent en deux grandes classes : les caséines (α_1 , α_2 , β et κ) (80%) et les protéines du sérum ou protéines solubles (20%) constituées essentiellement de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, de protéoses-peptones et d'immunoglobulines (**Amiot *et al.*, 2002 ; Keenan et Patton, 1995**).

La valeur nutritionnelle des protéines laitières est excellente. Elle repose sur leur forte digestibilité (>95%) et sur une composition en acides aminés essentiels particulièrement bien équilibrée permettant de satisfaire les besoins de l'homme (**Léonil *et al.*, 2001**). Les protéines du lait sont également riches en phosphore, ce qui leur confère une bonne capacité à fixer certains minéraux (calcium) et oligo-éléments (fer, zinc), sous une forme assimilable (**Amiot *et al.*, 2002**). En plus de cet intérêt nutritionnel indéniable, les protéines laitières et certains peptides issus de leur digestion ont des effets biologiques sur différents systèmes de l'organisme. Parmi ces effets, on peut citer l'activation du système immunitaire, des effets hypotenseurs, les actions antimicrobiennes et antistress (**Clare et Swaisgood, 2000 ; Maubois, 2008 ; Maubois *et al.*, 1991**).

Le tableau II donne quelques bienfaits des protéines du lait sur la santé.

Tableau II : Effets bénéfiques des constituants protéiques et peptidiques du lait sur la santé (Léonil *et al.*, 2001)

	Digestion	Pression sanguine	Immunité	Inflammation	Activité anti microbienne	Activité anti cancer
Protéines sériques	-	+	+	+	+	+
Sérum albumine	-	-	-	-	-	+
Lactoferrine	-	-	+	-	+	+
α -lactalbumine	-	-	-	-	-	+
Peptides	+	+	+		+	
Lactoperoxydase	-	-	+	-	+	-
Glycomacropéptides	+	-	-	-	+	-
Phosphopeptides	+	-	+	-	-	-

+ : effet avéré

- : absence d'effet

Sur le plan technologique, la structure et les propriétés physico-chimiques des protéines du lait offrent d'autres atouts. Dans le lait, les molécules de caséines sont associées entre elles et à des composants minéraux (calcium et phosphore) sous forme de particules sphériques appelés micelles de caséines dont le diamètre varie entre 30 et 300 nm (**McMahon et McManus, 1998 ; Swaisgood, 1995**). Au pH habituel du lait frais, en moyenne 6,6, les micelles de caséines sont en suspension colloïdale dans la phase aqueuse. Les micelles de caséines coagulent sous l'action de la présure ou des bactéries lactiques à un pH d'environ 4,6. La fabrication des produits laitiers fermentés est basée sur cette propriété des caséines (**Amiot et al., 2002 ; Brulé et al., 1997 ; Daviau et al., 2000**). Les protéines sériques quant à elles, sont solubles à pH 4,6, précipitent sous l'action de la chaleur et ne sont pas coagulées par les enzymes (**Amiot et al., 2002**). Lors de l'égouttage des fromages, elles vont se retrouver en majorité dans le lactosérum.

3. Matière grasse du lait

A la vente, les laits de consommation sont proposés en fonction de leur teneur en matière grasse (MG), respectivement 3,5 % pour le lait entier, entre 1,5 et 1,8 % pour le lait demi-écrémé et moins de 0,5 % pour le lait écrémé. A la traite, le lait de vache contient en moyenne 37 g/L (**Amiot et al., 2002**). La matière grasse du lait se présente sous la forme d'une émulsion de globules gras d'un diamètre moyen de 0,2 à 15 µm. Elle est composée à 99,5 % de lipides, le reste étant constitué de substances liposolubles appelées également «substances lipoidiques» ou «fraction insaponifiable ». Cette dernière est constituée d'hydrocarbures (dont le carotène), d'alcools (dont le cholestérol), de tocophérols et de vitamines liposolubles A, D et K (**Amiot et al., 2002**).

Du point de vue nutritionnel, la matière grasse ne véhicule pas toujours une image positive auprès des consommateurs. Pourtant ses intérêts nutritionnels sont bien réels. Les acides gras, particulièrement les acides gras saturés dont la proportion peut aller jusqu'à 62 % dans les produits laitiers, sont utilisés comme source d'énergie. La matière grasse fournit à elle seule 48 % de la valeur énergétique du lait entier (**Amiot et al., 2002**). Les effets bénéfiques de certains acides gras sur la santé ont été rapportés par plusieurs auteurs. L'acide butyrique serait un modulateur de la fonction génomique et interviendrait dans la prévention du cancer (**German, 1999**). L'acide laurique exercerait des fonctions antivirale et antibactérienne, et pourrait agir contre les caries et les plaques dentaires (**Haug et al., 2007**).

Les acides gras insaturés ne sont pas en reste. L'acide oléique qui est l'acide gras insaturé ayant la plus forte concentration dans le lait, 8 g/L, réduirait les concentrations de cholestérol plasmatique, de LDL-cholestérol et de triglycérides (**Kris-Etherton *et al.*, 1999**). Selon **Mensink *et al.* (2003)**, le remplacement des acides gras saturés par l'acide oléique réduirait les risques de maladie coronarienne. A côté de ces acides gras, d'autres composantes lipidiques qui accompagnent la matière grasse au cours de son absorption comme les vitamines A et D, jouent également un rôle essentiel dans l'organisme.

4. Glucides du lait

La fraction glucidique du lait est essentiellement représentée par le lactose dont la teneur est voisine de 46 g/litre (**Amiot *et al.*, 2002**). Sur le plan alimentaire, le lactose a un rôle énergétique et représente environ 30% de la valeur calorique du lait entier. Lors de son utilisation par l'organisme, le lactose se digère facilement en glucose et en galactose par une lactase produite par la muqueuse intestinale appelée β -galactosidase (**Léonil *et al.*, 2001**). La localisation de cette enzyme en bordure de l'intestin la rend très sensible. Tout ce qui perturbe l'intégrité de la muqueuse intestinale peut entraîner un déficit temporaire en cette enzyme dont l'activité décroît également avec l'âge. Dans les cas extrêmes et très rares, le déficit en lactase peut être congénital. Lors de la consommation du lait, les personnes qui ont un déficit en lactase présenteront une intolérance au lactose qui se traduira par des troubles digestifs comme la diarrhée, les coliques et les flatulences (**Amiot *et al.*, 2002**). Actuellement, grâce au progrès technologique, il est possible de proposer au consommateur des laits à teneur réduite en lactose. Dans ce cas, le lactose est partiellement éliminé par ultrafiltration ou par hydrolyse enzymatique. Il est également bien établi que des personnes ayant des déficiences primaires ou secondaires en lactase tolèrent mieux les laits fermentés (**Arrigoni *et al.*, 1994, Salomns, 2002**).

En technologie laitière, la présence du lactose est indispensable à la fabrication des produits laitiers fermentés car ce dernier constitue le substrat des bactéries lactiques, responsables de la fermentation.

5. Minéraux et les vitamines

La richesse du lait en différents minéraux comme le calcium (1,2 g/L), le magnésium (108 mg/L), le zinc (3,9 mg/L) (Amiot *et al.*, 2002) en fait un aliment très adapté à la croissance des jeunes et des adolescents. Le lait contient également plusieurs vitamines du groupe B qui interviennent dans le métabolisme énergétique. C'est aussi une excellente source de vitamine B₁₂ qui potentialise l'acide folique, qui à son tour, active la synthèse des protéines nécessaires à la croissance cellulaire. La teneur du lait de vache en différents nutriments et leurs effets bénéfiques sur la santé sont récapitulés dans le tableau III.

Tableau III : Teneur du lait de vache en différents nutriments et leurs effets bénéfiques sur la santé (Haug *et al.*, 2007)

Constituants	Teneur par L de lait entier	Apport Journalier pour 0,5 L	Effets sur la santé
Matière grasse	33 g	-	Source d'énergie
Acides gras saturés	19 g	-	Augmentation du HDL, du LDL et du cholestérol total, inhibition des bactéries et des virus
Acide oléique	8 g	-	Réduction du cholestérol plasmatique, de LDL-cholestérol et du CDH
Acide laurique	0,8 g	-	Antiviral et antibactérien
Acide myristique	3,0 g	-	Augmentation du LDL et HDL
Acide palmitique	8 g	-	Augmentation du LDL et HDL
Acide linoléique	1,2 g	-	Source d'Oméga-6
Acide α -linoléique	0,75 g	-	Source d'Oméga-3
Protéines	32 g	30-40%	Acides aminés essentiels, peptides bioactifs, facteurs de croissance et activité immunostimulante
Lactose	53 g	-	Source d'énergie
Calcium	1,1 g	40-50%	Formation et entretien des os et de dents, maintien de la pression sanguine, contraction musculaire.
Magnésium	100 mg	12-16%	Traitement de l'asthme, prévention du vieillissement
Zinc	4 mg	18-25%	Fonction immune, expression des gènes, développement du fœtus
Sélénium	37 μ g	30%	Réduction des cancers, des allergies et du CDH
Vitamine E	0,6 mg	2%	Antioxydant
Vitamine A	280 μ g	15-20%	Vision et différenciation cellulaire
Folate ou vit B ₉	50 μ g	6%	Synthèse d'ADN, division cellulaire et métabolisme des acides aminés.
Riboflavine (vit B ₂)	1,83 mg	60-80%	Métabolisme énergétique de toutes les cellules, croissance et réparation des tissus, production d'hormones, formation des globules rouges.
Vitamine B ₁₂	4,4 μ g	90%	Fabrication des globules rouges et du tissu osseux, entretien des cellules nerveuses

II. MICROORGANISMES DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS FERMENTES

La composition de la microflore du lait et des produits laitiers fermentés se différencie en celle dite «sauvage» naturellement présente dans le lait de fabrication et dans l'environnement et la microfloreensemencée dans le lait sous forme de ferments encore appelés levains. Cette microflore est constituée en majorité de bactéries et dans une moindre mesure de levures et moisissures (Desmasures *et al.*, 1997b ; Michel *et al.*, 2001).

1. Bactéries

Dès la sortie de la mamelle, le lait cru a déjà sa microflore qui peut inclure aussi bien les germes d'intérêt technologique que ceux potentiellement pathogènes pour l'homme (Latorre *et al.*, 2009 ; Oliver *et al.*, 2005 ; Schoder *et al.*, 2003). La présence d'autres germes est préjudiciable à la durée de vie du lait et des produits laitiers.

1.1. Bactéries d'intérêt technologique

La microflore d'intérêt technologique participe à la définition des caractéristiques sensorielles des produits laitiers fermentés. Cette microflore est constituée essentiellement de bactéries lactiques et dans une moindre mesure de bactéries corynéformes, de staphylocoques à coagulase négative, de levures et de moisissures.

1.1.1. Bactéries lactiques

Du point de vue phylogénique, les bactéries lactiques appartiennent au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. L'ordre des *Lactobacillales* regroupe six familles (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leucocaceae* et *Streptococcaceae*) dans lesquelles on dénombre plusieurs genres dont 15 seulement forment le groupe de bactéries lactiques. Il s'agit des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Stiles et Holzappel, 1997).

La figure 1 représente l'arbre phylogénétique des bactéries lactiques avec leur distance basée sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S.

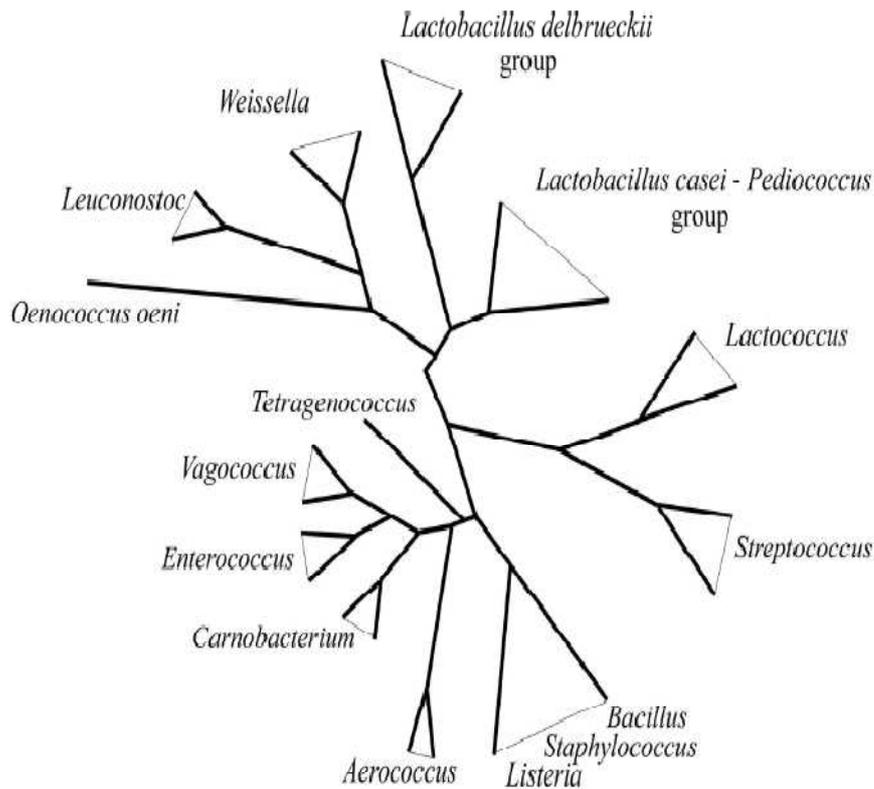


Figure 1 : Arbre phylogénétique des bactéries lactiques avec leur distance basée sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S (Axelsson, 1998)

Les bactéries lactiques doivent leur nom à la production massive d'acide lactique à partir de différents sucres dont le lactose, sucre majeur du lait. Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et sont reconnues au niveau international comme « GRAS » pour « *Generally Regarded As Safe* » c'est-à-dire saines dans leurs conditions d'utilisation (Adams *et al.*, 1995 ; Salminen *et al.*, 1998). Dans les aliments fermentés, les bactéries lactiques contribuent à la texture, à la saveur et à la production de composés aromatiques. Elles inhibent la prolifération de micro-organismes indésirables en abaissant le pH de leur environnement, en produisant des composés inhibiteurs, comme le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines (Adams *et al.*, 1988 ; Batdorj *et al.*, 2007 ; Ennahar *et al.*, 1999 ; Marty-Teyssset *et al.*, 2000). Certaines espèces produisent également des exopolysaccharides qui modifient l'aspect et la texture des produits fermentés (Van der Meulen *et al.*, 2007).

Deux groupes de bactéries lactiques, les lactocoques et les lactobacilles ont un intérêt majeur en technologie laitière.

1.1.1.1 Lactocoques

Le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Elles sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Les lactocoques retrouvés dans le lait ont pour origine principale le fourrage (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Michel *et al.*, 2001).

Les lactocoques ont été les premiers à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Ce sont des levains mésophiles en ce sens que leur température optimale de croissance s'étend de 25 à 35°C, respectivement pour les souches de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Ils sont capables de croître à 10°C mais pas à une température supérieure à 40°C. Les lactocoques comprennent des espèces acidifiantes, telle que *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, et celles qui participent à la formation d'arômes comme *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* et *diacetylactis* (Ayad *et al.*, 1999 ; Yvon et Rijnen, 2001).

1.1.1.2. Lactobacilles

Les bactéries du genre *Lactobacillus* ont des aspects variés allant du bacille long et fin au coccobacille en passant par la forme bâtonnet court ou légèrement flexueux. Ce sont des Gram positif, non sporulés, fréquemment associés en chaînettes et immobiles. Contrairement aux lactocoques, il existe très peu d'informations concernant les populations de lactobacilles dans les laits. Ils sont, en effet, souvent dénombrés indistinctement des autres bactéries lactiques, telles que les leuconostoc ou les pédiocoques (Demarigny, 1997). Parmi le genre *Lactobacillus*, l'espèce *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, indispensable à la préparation du yaourt est la plus utilisée en industrie laitière.

Le métabolisme des sucres des lactobacilles permet d'y distinguer trois groupes. Le premier groupe est constitué de lactobacilles homofermentaires stricts qui produisent très majoritairement de l'acide lactique.

Les principales espèces de ce groupe sont *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* et *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Le deuxième groupe comprend les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs qui produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés, généralement l'acétate et l'éthanol. Les représentants de ce groupe sont *Lb. plantarum*, *Lb. sake* et *Lb. casei*. Enfin le dernier groupe est composé de lactobacilles hétérofermentaires stricts représentés principalement par *Lb. brevis* et *Lb. fermentum* (Desmaures et Guéguen, 1997)

1.1.1.3. Autres bactéries lactiques

Les Leuconostocs sont fréquemment rencontrés dans le lait cru mais les données quantitatives les concernant sont quasiment inexistantes car ces derniers sont le plus souvent dénombrés indistinctement des autres bactéries lactiques (Desmaures et Guéguen, 1997). Les leuconostocs interviennent dans le goût et l'arôme du lait grâce à la production de certains composés aromatiques comme l'acétoïne et le diacétyl. Les espèces fréquemment isolées sont *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. lactis* et *Ln. mesenteroides*.

Le lait et les produits laitiers peuvent contenir les bactéries lactiques du genre *Enterococcus*. Les entérocoques présents dans le lait cru proviendraient d'une contamination fécale au cours de la traite ou lors du stockage du lait (Desmaures 1997). Les espèces les plus fréquemment rencontrées en industrie laitière sont *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus durans*.

Des streptocoques sont également présents dans le lait. *St. thermophilus* ssp. *salivarius* est associé à *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* dans le yaourt. D'autres streptocoques non lactiques comme *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae* sont retrouvés dans le lait cru en cas de mammite

Le tableau IV donne quelques espèces de bactéries lactiques utilisées dans la fabrication de certains aliments fermentés.

Tableau IV: Quelques utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentation
(Atlan *et al.*, 2000)

Utilisation	Bactéries lactiques (et autres micro-organismes associés)
Laits fermentés	
Yaourt	<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> et <i>Str. thermophilus</i>
Autres laits fermentés	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i>
Kéfir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefirianofaciens</i> , <i>Lb. kefirgranum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i>
Fromages affinés	
Camembert et Brie	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> et <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>
Emmental et Gruyère	<i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. helveticus</i> ou <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> ou <i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>
Mozzarella	<i>Str. thermophilus</i> et <i>Lb. helveticus</i> ou <i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
Cheddar	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> et <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> et <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Roquefort	<i>Str. thermophilus</i> et <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> et <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> et <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Viandes	
Saucisses	<i>Pc. acidilactici</i> et <i>Pc. pentosaceus</i> , <i>C. divergens</i> , <i>Cl. piscicola</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. curvatus</i>
Semi-conserves	<i>Ln. carnosum</i> et <i>Ln. gelidum</i> , <i>C. divergens</i> , <i>C. piscicola</i>
Poissons marinés	<i>T. halophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>
Sauce de soja	<i>T. halophilus</i>
Boulangerie	<i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i>
Panification	<i>Lb. plantarum</i> (en association avec <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Boissons	
Vins	<i>Oenococcus oeni</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

C. : *Carnobacterium* ; *Lc.* : *Lactococcus* ; *Ln* : *Leuconostoc* ; *Lb* : *Lactobacillus* ; *Pc* : *Pediococcus* ; *Str* : *Streptococcus* ; *T* : *Tetragenococcus*

1.1.2. Bactéries non lactiques d'intérêt technologique

Dans les laits fermentés et à la surface de certains fromages, on trouve suite à un ensemencement naturel et/ou dirigé une flore d'affinage non lactique constituée de bactéries corynéformes et de staphylocoques non pathogènes. Pendant longtemps, le terme de bactérie corynéforme a regroupé les bactéries dont la morphologie était en forme de « massue ». Sur le plan taxonomique, ce groupe a beaucoup évolué et inclut les ordres des *Micrococcineae* et des *Corynebacterineae* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les produits laitiers appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Micrococcus*. Grâce à leurs propriétés lipolytiques et protéolytiques, les bactéries corynéformes participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés (**Ratray et Fox, 1999**) et à la coloration de certains fromages (**Dufossé et al., 2001**). Enfin, les staphylocoques à coagulase négative d'origine laitière ont des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui leur permettent de participer à la formation de la croûte des fromages (**Curtin et al., 2002**) et à l'aromatisation des produits laitiers fermentés (**Hoppe-Seyler et al., 2004 ; Irlinger et al., 1997**).

1.2. Bactéries d'altération et/ou potentiellement pathogènes

1.2.1. Les bactéries psychrotrophes

Les germes psychrotrophes sont définies par leur aptitude à se développer à des températures inférieures à +7°C et sont donc capables de se multiplier aux températures habituelles de réfrigération du lait, c'est-à-dire + 2 à + 4°C. Agents de toxi-infections alimentaires ou d'altération de la qualité marchande des denrées, ils constituent un facteur limitant la conservation des produits réfrigérés. Les bactéries du genre *Pseudomonas* représentent la majorité de la microflore psychrotrophe mais d'autres espèces appartenant aux genres *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* ou *Arthrobacter* en font également partie (**Desmaures, 1997a**). D'autres bactéries psychrotrophes et potentiellement pathogènes telles *Campylobacter jejuni* et *Listeria monocytogenes* ont été également mises en évidence dans du lait cru ou dans des produits laitiers fermentés au lait cru (**Lattore et al., 2009 ; Oliver et al., 2005 ; Schoder et al., 2003**).

1.2.2. Staphylocoques à coagulase positive

Les staphylocoques sont souvent présents dans le lait et les produits laitiers (**Afif et al., 2009 ; Bonfoh et al., 2005 ; De Buyser et al., 1998 ; Michel et al., 2001, Minl'a et al., 2001**). Certaines espèces productrices de coagulase libre et/ou d'entérotoxines sont potentiellement pathogènes. Ces dernières sont au nombre de sept (7) : *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. delphni*, *S. schleiferii subsp.coagulans*, *S. hyicus* et *S.anaerobius*. De toutes les espèces de staphylocoques à coagulase positive, *S. aureus* est la plus pathogène et a été plusieurs fois impliquée dans des intoxications alimentaires (**De Buyser, 2001**).

1.2.3. Entérobactéries

On désigne sous le vocable d'entérobactéries, les bactéries de la famille d'*Enterobacteriaceae* qui colonisent le tractus digestif de l'homme et des animaux. Dans la famille des *Enterobacteriaceae*, on retrouve les coliformes fécaux (ou thermotolérants) et les coliformes non fécaux. Les premiers ont leur optimum de croissance à 41-44°C et ne se développent pas en dessous de 4°C. Les principales espèces de ce groupe rencontrées dans les produits laitiers appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Yersinia* et *Klebsiella*. Les coliformes non fécaux sont psychrotrophes et ne se multiplient pas à 41-44°C. Les principales espèces laitières appartiennent aux genres *Serratia*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Coiffier, 1992 ; Ogier *et al.*, 2002 ; Tornadijo *et al.*, 2001). Sur le plan technologique, les coliformes sont souvent associés à un défaut d'aspect, principalement dans les fromages à pâte molle où ils sont responsables d'un gonflement précoce et de la formation de trous dans la pâte pendant les premiers jours d'affinage (Fox *et al.*, 2000).

1.2.4. Bactéries sporulées

Les bactéries sporulées sont répandues dans le sol et l'environnement des étables. Elles peuvent se retrouver dans le lait même pasteurisé en raison de la persistance de leurs spores après traitement thermique. Certaines bactéries, comme *Bacillus cereus* sont redoutées en raison des risques qu'elles présentent pour la santé du consommateur. En France, la contamination des laits crus par les spores varie avec les saisons : faible en été (100 à 500 spores par litre), elle présente un pic pouvant atteindre 10^3 spores par litre en hiver, du fait de la consommation d'ensilage dans lequel les spores sont capables de germer (Michel *et al.*, 2006).

2. Champignons : levures et moisissures

Les levures sont des champignons unicellulaires alors que les moisissures sont des champignons filamenteux unis ou multicellulaires.

Les levures sont présentes dans le sol, l'air et les eaux. Elles peuvent être isolées de nombreux produits alimentaires et font partie de la microflore banale du lait cru. Les espèces dominantes retrouvées dans le lait et les produits laitiers appartiennent aux genres *Candida*,

Kluyveromyces, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* et *Yarrowia* (**Baroiller et Schmidt, 1990 ; Fröhlich-Wyder, 2003**). En fromagerie, les levures interviennent dans la désacidification progressive de la surface des fromages, permettant ainsi l'implantation et le développement de la flore bactérienne superficielle acido-sensible et halotolérante, comme les bactéries corynéformes et les staphylocoques à coagulase négative (**Corsetti et al., 2001**). Les levures contribuent également à la flaveur des fromages (**Choisy et al., 1997b**).

La présence des moisissures internes ou superficielles caractérise divers types de fromages. *Penicillium camemberti* est le champignon des fromages à pâte molle et à croûte fleurie, type Camembert, Brie ou Roquefort (**Lenoir et al., 1984**) ou de fromages de chèvre (**Choisy et al., 1997b**). Dans les laits fermentés, la présence des levures et moisissures est associée à un défaut d'hygiène.

3. Facteurs de variation de la composition microbienne des laits

3.1. Variation saisonnière de la composition microbienne des laits

Des études portant sur l'évolution de la composition microbiologique des laits des différentes exploitations montrent que le profil des microorganismes utiles est globalement conservé sur une année (**Callon et al., 2007, Tormo et al., 2011a**). La microflore d'altération (*Pseudomonas*) est caractérisée par une variabilité saisonnière importante alors que les espèces potentiellement pathogènes, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*, par leur apparition sporadique, restent des microorganismes de contamination (**Desmaures 1997a ; Michel et al., 2001**).

3.2. Variation en fonction des pratiques d'élevage

Les études conduites dans les exploitations françaises pour trouver les liens entre la composition microbiologique des laits et les pratiques des producteurs ont montré que ces deux paramètres sont corrélés. Ces microorganismes utiles semblent être également caractéristiques de chaque exploitation (**Callon et al., 2007, Tormo et al., 2011a, 2011b**).

Le profil microbiologique d'un lait donné peut donc s'expliquer par l'état sanitaire des animaux, la nature des fourrages, les pratiques en matière d'hygiène du matériel de traite et

des soins apportés aux mamelles, le système de traite (longueur des canalisations) sans oublier les conditions de stockage du lait (**Michel *et al.*, 2001**).

III. LES PRODUITS LAITIERS FERMENTES

Pour conserver le lait, aliment hautement périssable, l'homme a de tout temps et en tout lieu cherché à le préserver en le transformant (allongement de la durée de vie, concentration des éléments nutritifs). Selon les estimations de la FAO, environ 60 % des 693,2 millions de tonnes de lait produit à travers le monde en 2008, ont été acheminés vers l'industrie laitière pour la transformation. Parmi les techniques de transformation disponibles, figure la fermentation qui consiste en une coagulation de la caséine du lait par des ferments lactiques ou par la présure. Les produits issus de cette fermentation sont essentiellement le yaourt, les laits fermentés et certains fromages. En Afrique occidentale et orientale, 71% de la production du lait sont transformés en lait fermenté (**Duteurtre, 2003**). Au Sénégal, le lait fermenté appelé communément « lait caillé » est pratiquement la seule forme de valorisation du lait produit localement (**Anonyme 1, 2007**).

La dénomination « lait fermenté » est réservée aux produits à base de lait, partiellement concentré ou non, qui ont subi une fermentation principalement lactique aboutissant à la formation d'un gel (**Hermier et Accolas, 1989**). Par définition, le yaourt ou yoghourt est un lait fermenté exclusivementensemencé avec deux bactéries spécifiques, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*.

Les fromages sont définis dans la norme internationale *Codex Alimentarius* comme étant « le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait. Il est obtenu soit par la coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation ; soit par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir de lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut » (**Commission du Codex Alimentarius, 1978**).

1. Phénomène de la coagulation du lait

1.1 Coagulation acide

La coagulation acide est un processus au cours duquel le lactose, sucre majeur du lait, est transformé en acide lactique par les bactéries lactiques. La production d'acide lactique entraîne la régression de l'ionisation des fonctions acides des caséines et par conséquent la diminution du pouvoir séquestrant des caséines α_s et β vis-à-vis des minéraux. Les micelles ainsi dépourvues de leur élément stabilisateur (phosphate de calcium) se désagrègent en leurs sous-unités, les submicelles. Si le lait est en mouvement, il apparaît un « flocculat » baignant dans la phase aqueuse. Par contre, lorsque le lait est au repos, les submicelles se lient entre elles pour former un réseau protéique qui occupe tout le volume initial en englobant dans ses mailles, la totalité de la phase aqueuse. Si l'acidification se poursuit jusqu'au pH isoélectrique moyen des caséines ($pH_i=4,6$), leurs charges se neutralisent, leur hydratation se réduit fortement et leur structure submicellaire disparaît. A ce stade, le gel correspond à une organisation tridimensionnelle de protéines relativement fragile car les liaisons mises en place bien que très nombreuses sont de très faible énergie (Mietton *et al.*, 1994 ; St-Gelais *et al.*, 2002).

La coagulation acide dépend essentiellement de la teneur en protéines des laits de fabrication, de la température, de la vitesse et du niveau d'acidification et de l'apport en minéraux. Pour une même valeur de pH, un caillé à base de lait de brebis est plus ferme qu'un caillé de lait de vache lui-même plus ferme qu'un caillé de lait de chèvre (St-Gelais *et al.*, 2002). La température agit sur les équilibres minéraux du lait et par conséquent sur la quantité de calcium et de phosphate liés aux protéines dans la micelle. La vitesse d'acidification, qui dépend de la nature du ferment, de la température et dans le cas de fabrication fromagère du pH obtenu en fin de pré-maturation, a une très grande importance sur la cohésion du gel et sa propension à l'égouttage. En ce qui concerne les apports en minéraux, lorsque le lait de fabrication est chauffé à haute température (95°C pendant 1 à 5 min), il est souvent enrichi en ions calcium pour améliorer la séparation des phases. En effet, sous l'effet du chauffage une grande partie de calcium est insolubilisée (Anema, 2009 ; Law, 1996). Dans la fabrication de certains fromages traditionnels, il est courant de saler le lait juste avant l'emprésurage. Le sodium déplace le calcium, ce qui améliore la coagulation. Le coagulum résultant d'une coagulation acide est de consistance plus ou moins ferme, sans exsudation de lactosérum.

En fromagerie, pour obtenir un caillé plus ferme, l'on utilise des enzymes coagulantes combinées ou pas à l'acidification par les bactéries lactiques.

1.2. Coagulation enzymatique

Diverses enzymes protéolytiques ont la propriété de coaguler le lait. Elles sont d'origine animale, végétale ou microbienne. Toutefois, les préparations coagulantes d'origine végétale sont rarement utilisées en raison de leur pouvoir coagulant très variable et de leur activité protéolytique excessive (Eck, 1999). La présure, constituée d'un mélange de chymosine (80 %) et de pepsine (20 %) est l'enzyme la plus ancienne et toujours la plus employée. Les fromages à caractère présure dominant sont obtenus par l'utilisation de doses élevées de présure (de 25 à 40 mL de présure au 1/10 000 pour 100 L de lait). Le tableau V donne l'origine des différentes enzymes utilisées en fromagerie.

Tableau V : Origine de différentes enzymes utilisées pour coaguler le lait (Mietton *et al.*, 1994)

	Origine	Enzymes
Animaux	Ruminants	Chymosine +Pepsine Pepsine+ Chymosine Pepsine Pepsine
	<ul style="list-style-type: none"> • Veau • Chevreux • Agneaux • Bovins adultes 	
	Monogastriques	
	<ul style="list-style-type: none"> • Porcs 	
	Oiseaux	
	<ul style="list-style-type: none"> • Poulets 	
Végétaux	<ul style="list-style-type: none"> • Figuier (suc) • Ananas (tige) • Chardon, artichaut • Gaillet 	Ficine Broméline
Moisissures	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Endothia parasitica</i> • <i>Mucor pusillus</i> • <i>Mucor miehei</i> • <i>Aspergillus niger</i> 	Protéase Protéase Protéase Chymosine « génétique »
Levures	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Kluyveromyces lactis</i> 	Chymosine « génétique »
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> 	Chymosine « génétique »
	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i> 	Subtiline « génétique »

2. Technologie de fabrication des produits laitiers fermentés

2.1. Yaourt

Le yaourt peut être préparé avec des laits écrémés ou non, pasteurisés, ou stérilisés, éventuellement additionnés de poudre de lait. L'adjonction de la poudre de lait permet d'améliorer la consistance du yaourt. Le lait pasteurisé ou stérilisé est refroidi jusqu'à la température d'ensemencement (42-45°C) qui se fait avec les deux bactéries spécifiques du yaourt *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Ces deux bactéries ont des rôles très complémentaires. *Lactobacillus delbrueckii* ne produit que de l'acide lactique et sa croissance optimale se situe autour de 45-50 °C. *Streptococcus thermophilus* est moins acidifiant mais participe à la production de composés aromatiques, principalement l'acétaldéhyde, l'acétoïne et le diacétyl. Au terme de la fermentation qui dure environ 2 heures à une température de 42-45°C, le lait coagulé est devenu un yaourt contenant 100 millions de bactéries vivantes par gramme. Il est ensuite refroidi et/ou conditionné avant d'être soumis à la vente ou à la consommation.

La figure 2 résume les étapes de la fabrication du yaourt.

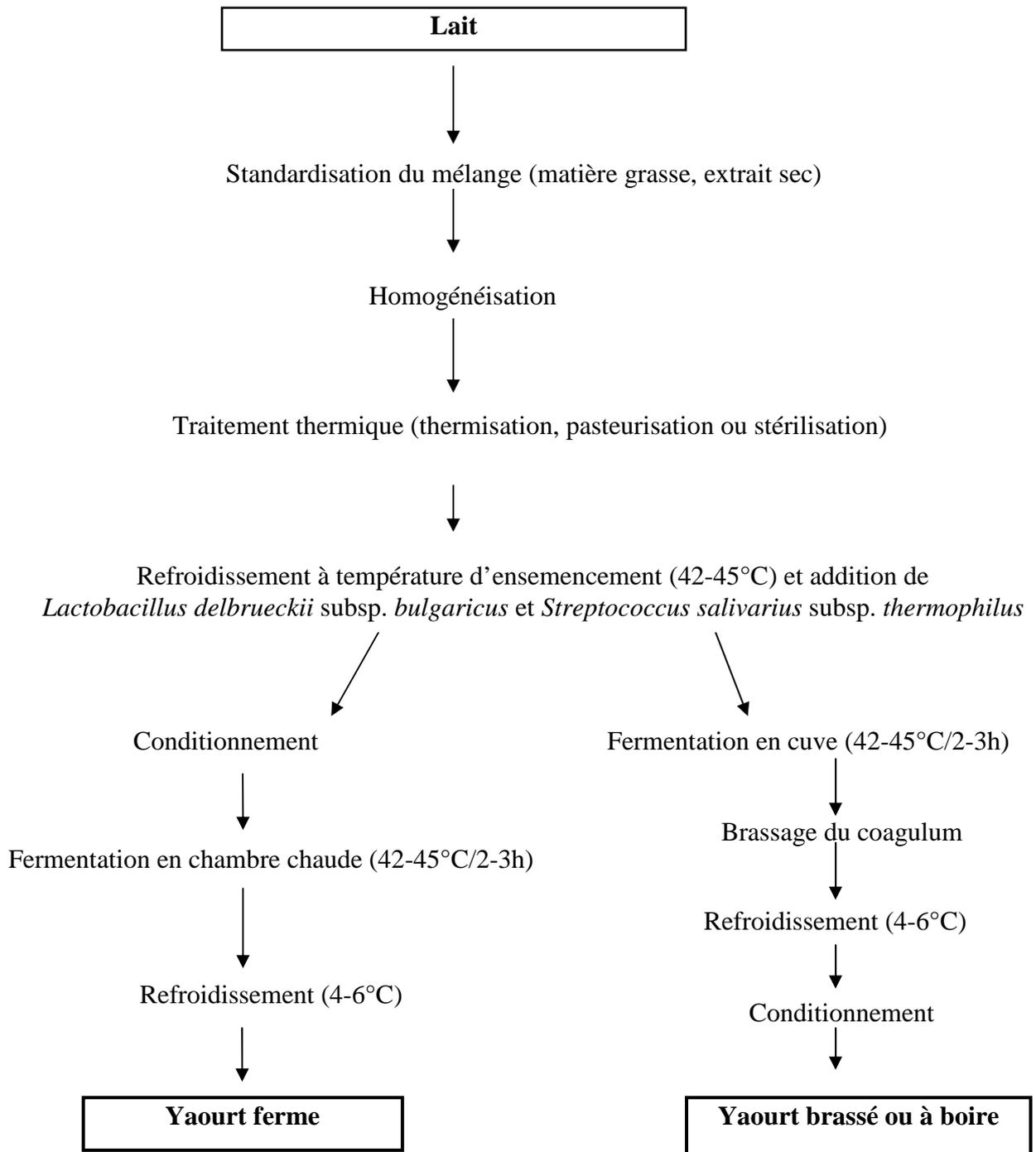


Figure 2 : Diagramme de fabrication du yaourt (Lamontagne, 2002)

2.2. Les autres laits fermentés

Alors que le yaourt est un lait fermenté exclusivement ensemencé avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, la dénomination "laits fermentés" concerne des laits où d'autres bactéries sont employées.

Tout comme dans les yaourts, au moment de la consommation, les bactéries lactiques des laits fermentés devraient être vivantes et en nombre suffisant.

Dans le groupe des laits fermentés, on peut citer les laits fermentés aux bifidobactéries, les laits à l'acidophile, le Kéfir, le Koumis, le leben et le babeurre fermenté ou buttermilk. Les bifidobactéries ont toutes une origine intestinale animale ou humaine, l'espèce la plus utilisée en industrie laitière est *Bifidobacterium animalis*. Quant au lait à l'acidophile, il fut imaginé aux Etats-Unis après les études d'Orla-Jensen qui avaient montré que les bactéries du yaourt étaient incapables de se développer dans l'intestin, et que certaines bactéries lactiques pouvaient être isolées à partir de fèces de nourrissons (Veysere, 1975).

Parmi les laits fermentés, il faut noter également les laits caillés traditionnels africains dans lesquels la fermentation est sous la dépendance des bactéries lactiques non définies, naturellement présentes au départ dans le lait ou apportées par l'ambiance des ateliers de fabrication.

Au Sénégal, les laits fermentés traditionnels sont obtenus à partir du lait cru de vache. Cependant, lorsque la production laitière devient faible, on utilise la poudre de lait reconstitué. Pour accélérer la fermentation, certains transformateurs artisanaux ajoutent des comprimés « caille lait », contenant des enzymes coagulantes et vendus en pharmacie. D'autres utilisent la technique du pied de cuve en ajoutant un peu de caillé de la veille pour fermenter le lait cru du jour (Duteurtre, 2003 ; Seydi *et al.*, 1993).

Dans les fermentations industrielles, deux types de levains sont également distingués : les mésophiles et les thermophiles. Les levains mésophiles (constitués de *Lactococcus*, *Leuconostoc*) sont utilisés pour les fermentations dont la température des caillés pendant la phase d'acidification ne dépasse pas 40°C, alors que les levains thermophiles (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*) sont employés lorsque la température en début de fabrication dépasse 40°C (Fleet, 1999 ; Parente et Cogan, 2004).

Le tableau VI donne quelques exemples de laits fermentés et leurs caractéristiques.

Tableau VI : Quelques exemples de laits fermentés et leurs caractéristiques (Anonyme 3, 2009)

Nom	Pays d'origine présumé	Description	Levains
Yaourt ou Yoghourt	Asie, Balkans	Produit ferme ou brassé, acide, arôme caractéristique	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> (+ <i>Lb. acidophilus</i> et <i>Bifidobacterium</i> sp. selon les réglementations)
Lait à l'acidophilus	Etats-Unis	Produit ferme, brassé ou liquide, faible arôme	<i>Lb. acidophilus</i>
Kéfir	Caucase	Boisson brassée, consistance crémeuse contenant du CO ₂ et même de l'éthanol	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., levures
Koumis	Mongolie	Boisson pétillante, acide, goût rafraîchissant	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , levures
Lassi	Inde	Boisson laitière aigre diluée avec de l'eau, consommée salée, épicée ou sucrée	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., levures
Dahi	Inde	Produit ferme ou brassé, ou boisson liquide ; flaveur agréable, acide ou faiblement acide	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lc. diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> sp.
Leben	Moyen Orient	Produit ferme ou brassé, goût et arôme agréable	<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lc. lactis</i> , levures
Filmjölkk	Suède	Boisson brassée visqueuse, saveur acidulée	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. diacetylactis</i> , <i>Ln. cremoris</i>
Villi	Finlande	Produit brassé visqueux, acidulé et goût agréable	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. diacetylactis</i> , <i>Lc. dextranicum</i> , <i>Geotricum candidum</i>

Lc. : *Lactococcus* ; *Ln.* : *Leuconostoc* ; *Lb.* : *Lactobacillus* ; *Str.* : *Streptococcus*

2.3 Fromages à pâte molle

Sur le plan technologique, le fromage est le produit obtenu par coagulation du lait suivie d'un égouttage du coagulum. La masse obtenue qu'on appelle également « caillé » ou « caillebotte » peut être consommée en l'état (fromage frais) ou subir des transformations enzymatiques et microbiennes au cours de l'affinage. Cette masse constitue alors le fromage affiné ayant des caractéristiques organoleptiques spécifiques, en fonction de la conduite de l'affinage. Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale *Codex Alimentarius* comme étant tous les fromages dont la teneur en eau après élimination des matières grasses est supérieure à 67 % (**Commission du Codex Alimentarius, 1978**).

Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer permettant de diviser les fromages à pâte molle en deux groupes : les pâtes molles à croûte fleurie comme les Brie ou le Camembert et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morguée comme les Epoisses et le Munster.

Quatre ingrédients principaux interviennent dans la fabrication des fromages à pâte molle : le lait, la présure, les micro-organismes et le sel (**Beresford *et al.*, 2001**). La composition du fromage varie donc en fonction du type de lait utilisé et des paramètres technologiques appliqués. Ces variations se traduisent au niveau des pourcentages des constituants majeurs du fromage que sont l'eau, les lipides, les glucides, les protéines et le calcium.

De façon générale, la fabrication du fromage comprend quatre étapes principales, la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage.

La coagulation peut être précédée ou pas d'une étape de maturation ou pré-maturation ou maturation froide. La maturation froide consiste à ensemercer dès la réception les laits de fabrication par une faible quantité de ferment lactique mésophile, de l'ordre de 1% et en laissant reposer les laits pendant 12 à 18h à une température de 10 à 15°C. La pré-maturation a pour but d'améliorer le lait en tant que milieu de culture, pour les bactéries lactiques et de l'amener à son pH optimum pour l' emprésurage. Pour la fabrication des fromages à pâte molle, la coagulation est dite mixte puisqu'elle résulte à la fois d'une acidification par les bactéries lactiques et de l'action d'enzymes coagulantes telles que la présure.

L'égouttage est le résultat de deux phénomènes physiques différents : un phénomène actif, la synérèse, qui est due à la contraction du gel et un phénomène passif, résultant de l'aptitude du coagulum à laisser s'écouler le lactosérum inclus. Cette exsudation spontanée du sérum est une des caractéristiques des gels lactiques.

Le salage des fromages permet dans un premier temps de compléter l'égouttage. Il contribue également à la formation de la croûte. Par la régulation de l'activité de l'eau (A_w), le sel inhibe le développement de certains micro-organismes nuisibles.

Enfin, l'affinage est une succession de transformations biochimiques, réalisées à la fois par des enzymes déjà présentes dans le lait ou le caillé, et par des enzymes synthétisées par la microflore qui se développe au cours de la maturation (**Choisy *et al.*, 1997a ; Mahaut *et al.*, 2000**).

3. Rôles des bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés

Les bactéries lactiques utilisées dans la fabrication des produits laitiers fermentés ont pour principale fonction la production d'acide lactique. Par leurs métabolismes divers, elles participent aussi à l'élaboration et à la définition des qualités des produits laitiers fermentés. Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des substances à activité bactéricide ou de produire des effets bénéfiques sur la santé lorsqu'elles sont ingérées avec les aliments.

3.1. Production d'arômes par les bactéries lactiques

La formation des arômes par les bactéries lactiques fait appel à leur activité protéolytique et glycogénolytique. Le catabolisme des acides aminés, issus de la dégradation des caséines du lait, conduit à la production d'une large gamme de composés aromatiques. Sous certaines conditions de fermentation et pour quelques souches de *Lactococcus lactis*, une partie du pyruvate peut également dévier de la voie centrale de la glycolyse et être à l'origine de la formation de divers composés : acétaldéhyde, éthanol, acétate et formate (**Gummalla et Broadbent, 2001 ; Helinck *et al.*, 2004 ; Yvon et Rijnen, 2001**). L'autolyse de certaines bactéries lactiques peut conduire également à la libération des enzymes bactériennes intracellulaires dans la matrice fromagère. Ces enzymes accélèrent l'affinage et contribuent au développement de la flaveur dans les fromages (**Collins *et al.*, 2003 ; Gobbetti *et al.*, 1999**).

3.2. Préservation de la qualité sanitaire

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis l'antiquité pour conserver les denrées alimentaires. Du point de vue hygiénique, les bactéries lactiques jouent un rôle fondamental dans l'inhibition de certaines flores bactériennes et fongiques indésirables. Cette action inhibitrice est due à la production de substances antagonistes tels que les acides organiques (lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène et le diacétyle (**Benkerroum *et al.*, 2002 ; Holzapfel *et al.*, 1995**).

Certaines bactéries lactiques produisent de composés anti fongiques tels que les acides gras (Corsetti *et al.*, 1998) ou l'acide phényl-lactique (Valerio *et al.*, 2004). D'autres produisent des bactériocines qui sont des protéines complexes produits et libérés dans le milieu extérieur et ayant un effet antagoniste contre d'autres bactéries, généralement phylogénétiquement proches (De Vuyst et Vandamme, 1994 ; Ennahar *et al.*, 1999 ; Flynn *et al.*, 2002).

3.3. Allégations santé sur les bactéries lactiques

A l'origine, l'intérêt majeur de la fermentation du lait était de lui conserver ses principaux constituants. Au fil des années, les produits laitiers fermentés en l'occurrence le yaourt et le fromage, ont été reconnus comme des aliments possédant des qualités nutritionnelles indéniables. Actuellement, les produits laitiers fermentés frais sont classés parmi les aliments fonctionnels. L'ILSI (International Life Science Institute) définit un aliment fonctionnel comme ayant un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles dans l'organisme, au-delà des effets nutritionnels habituels, comme améliorant l'état de santé et de bien-être ou réduisant le risque d'une maladie (Marteau *et al.*, 2002). Lorsque cette fonctionnalité est en relation avec l'activité de leurs ferments, ce sont aussi des aliments probiotiques ou « novel foods ».

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui après ingestion, exercent des effets bénéfiques sur la santé allant au-delà des vertus nutritives inhérentes à l'aliment (Fuller, 1989, Schrezenmeir *et al.*, 2001). L'efficacité de ces probiotiques a été prouvée dans l'amélioration de la digestion du lactose (Arrigoni *et al.*, 1994), dans le traitement des diarrhées infectieuses et des troubles digestifs liés à la prise d'antibiotiques (Beausoleil *et al.*, 2007 ; Fukushima et Miyaguchi, 2007 ; Tuohy *et al.*, 2007) et dans l'augmentation de l'activité phagocytaire des granulocytes et des lymphocytes B sanguins (De Simone *et al.*, 1992 ; Schiffrin *et al.*, 1995).

Les bactéries lactiques consommés avec le lait, de part leur capacité à s'implanter dans le tractus digestif, sont susceptible de modifier la flore intestinale de l'hôte, en particulier de diminuer la quantité de germes indésirables (Leplingard *et al.*, 2006). Ainsi, plusieurs études indiquent que l'ingestion de lait fermenté par *Lb. acidophilus* est susceptible de réduire le nombre d'*E. coli* dans les selles qui contiennent alors considérablement plus de *Lb. acidophilus* qui, par ailleurs, fait partie de la flore intestinale humaine (Adams *et al.*, 1988).

D'autres effets bénéfiques tels que la diminution du cholestérol sanguin et le renforcement du système immunitaire ont été également attribués aux bactéries lactiques (**Drouault et Corthier, 2001 ; Loones, 1994**).

IV. FILIERE LAITIERE TRADITIONNELLE SENEGALAISE

1. Approvisionnement en lait : production locale et importations

Le secteur laitier sénégalais est marqué par une forte opposition entre d'une part, une production locale majoritairement issue des systèmes extensifs et d'autre part un secteur industriel basé sur l'utilisation de la poudre de lait importée. Entre 2004 et 2006, les importations des laits et produits laitiers ont connu une hausse de près de 30 % (tableau VII). L'essentiel de ces importations était constitué par la poudre de lait à hauteur de 86% (**Anonyme 1, 2007**). La poudre de lait importée va se retrouver dans 3 circuits différents : le circuit industriel qui offre des produits frais notamment les laits pasteurisés et fermentés, le circuit de micro-conditionnement du lait en poudre et enfin le circuit des micro-entreprises artisanales qui proposent du lait fermenté reconstitué. En tout état de cause, l'industrie laitière sénégalaise est dominée par la transformation artisanale même si on y trouve quelques multinationales dont les plus importantes sont Nestlé et Gloria. Ce secteur industriel n'est pas non plus connecté à la production locale (**Duteurtre, 2006**).

Tableau VII : Evolution du disponible en lait de 2000 à 2006

Année	Production locale (en million de litres)			Importations		Disponible	
	Vache	Chèvre	Total	Total (millions de L)	Pourcentage (par rapport au disponible)	Total (millions de L)	Par habitant (L)
2000	97,7	20,9	118,6	188,0	61	306,6	32
2001	100,1	21,5	121,6	168,2	58	289,8	30
2002	86,0	15,5	101,5	192,3	65	293,8	29
2003	92,3	18,1	110,4	254,2	70	364,7	35
2004	95,9	18,3	114,2	238,4	68	352,6	33
2005	97,3	18,9	116,2	288,4	71	404,5	37
2006	100,7	19,4	120,1	331,1	73	451,2	41

Source : Anonyme 1, 2007

2. Elevage au Sénégal

2.1. Troupeaux et leur potentiel laitier

Sur le territoire national, la production de lait est essentiellement assurée par les races bovines, la production de lait de chèvre restant très marginale. Le cheptel bovin est constitué de races locales, de races exotiques ainsi que de produits de leur croisement. Au Sénégal, trois types génétiques locaux sont exploités : le zébu (*Bos indicus* ou *Bos africanus*), le taurin (*Bos taurus*) et leurs produits de croisement. Ces animaux sont exploités en mode extensif avec une productivité limitée. Le rendement laitier par vache varie de 1 à 3 litres par jour. Pour pallier cette faible productivité, les races ou les gènes des espèces bovines à hautes potentialités laitières ont été introduits à partir des années 1960. Les gènes exotiques les plus communément exploitées sont la *Montbéliarde*, la *Jersiaise*, le *Girolando* et la *Holstein* (Séry, 2003). Toutes ces espèces bovines, locales, exotiques et métisses vont se retrouver dans trois systèmes d'élevages rencontrés au Sénégal.

2.2. Systèmes de production

Un système d'élevage est un ensemble de techniques et de pratiques mises en œuvre par une communauté donnée pour exploiter dans un espace donné des ressources végétales par des animaux, en tenant compte de ses objectifs et de ses contraintes (Lhoste *et al.*, 1993). Au Sénégal, la production du lait est assurée par trois systèmes de production, le système pastoral de type extensif, le système agro-pastoral ou semi-intensif et le système intensif.

Le système extensif ou pastoral ou système de production traditionnelle est le plus important, tant du point de vue des effectifs d'animaux exploités que de la population humaine concernée. Il est présent au Nord et au Centre-Nord du pays et exploite les animaux à faible potentiel laitier. La rareté des ressources alimentaires en saison sèche et l'insuffisance de couverture sanitaire des animaux, demeurent des contraintes majeures à la production du lait dans ce système (Duteurtre *et al.*, 2010). Le système agro-pastoral ou système semi-intensif est retrouvé au centre et dans le sud du pays. C'est un système de production mixte caractérisé par un élevage de type sédentaire avec l'intégration dans les activités pastorales, de cultures vivrières ou de rente comme l'arachide et le coton.

Dans ce système, en plus de la production laitière, les animaux remplissent d'autres fonctions telles que l'amendement des terres et la culture attelée. C'est également dans ce système que l'on trouve des projets d'amélioration des races locales par l'insémination artificielle. Le système de production intensif se retrouve principalement à la périphérie de la région de Dakar, dans la zone des Niayes où le climat est propice à l'élevage des races importées. Des fermes laitières ont été créées le plus souvent par des opérateurs privés. Leur existence est dictée par le désir de satisfaire la forte demande en lait de l'agglomération urbaine de Dakar. Le mode de conduite des troupeaux repose sur la stabulation permanente. Le régime alimentaire est à base de fourrages et de compléments sous forme de concentrés (Duteurtre *et al.*, 2010).

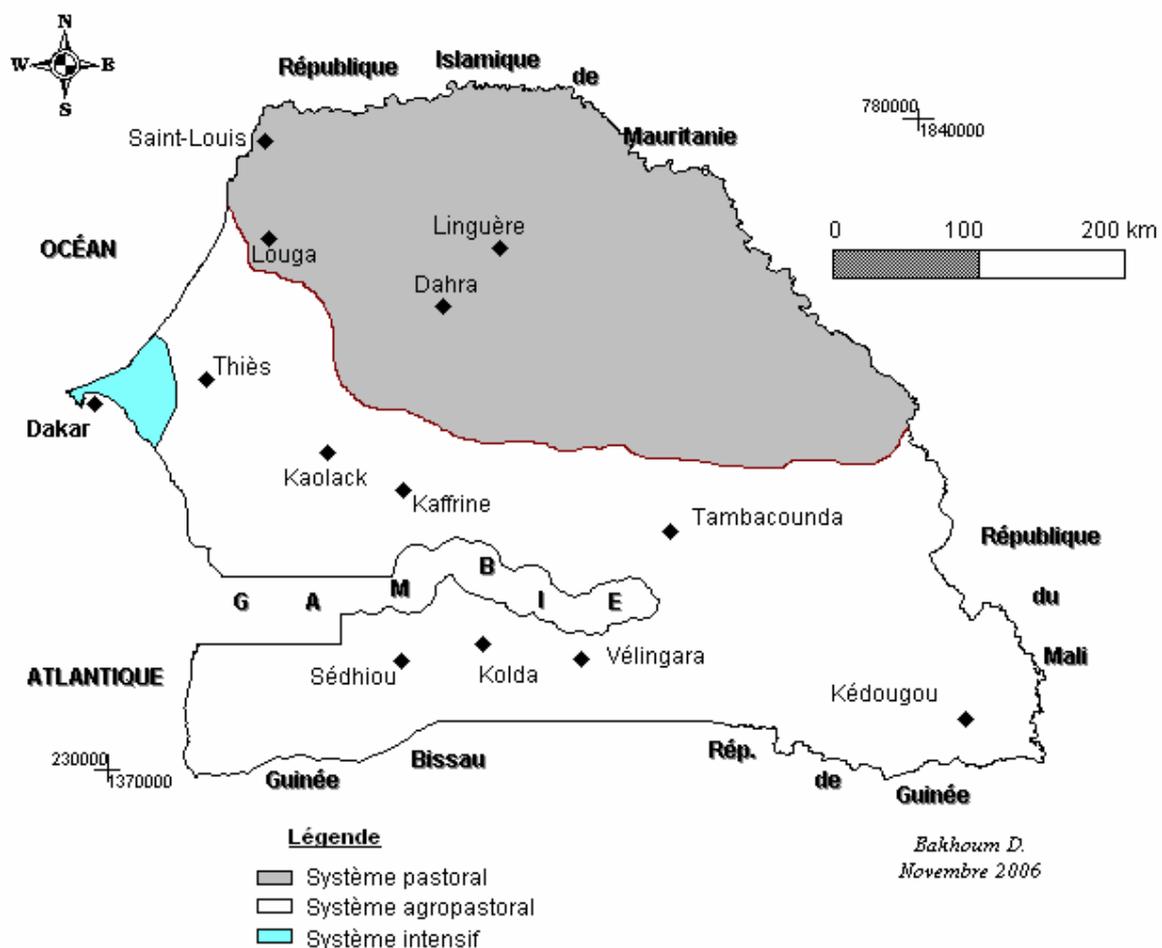


Figure 3 : Carte des zones éco-géographiques du Sénégal (Bakhoum, 2006)

En résumé, l'essentiel des animaux laitiers sont élevés de manière extensive et sont donc peu productifs. Les secteurs de la collecte et de la transformation sont très peu organisés et performants. La production locale n'est pas non plus connectée à l'industrie. Le lait de vache produit localement va se retrouver la plupart du temps dans un circuit traditionnel.

3. Filière lait local et les produits laitiers fermentés

Le lait étant une denrée très périssable, en absence de moyens de conservation efficace, l'essentiel de la production est transformé en lait caillé ou fermenté. C'est ainsi que sur l'ensemble du territoire national, les laits fermentés appelés communément laits « caillés » et l'huile de beurre (*diwnioor*) font l'objet d'un commerce très florissant. Les produits laitiers fermentés issus de la filière traditionnelle du lait vont se retrouver dans deux circuits de commercialisation principalement : ventes directes auprès des ménages ou au niveau des marchés ruraux hebdomadaires. Ces ventes sont relayées par des réseaux de femmes collectrices et détaillantes.

Cependant, il faudra noter que cette fermentation qui permet d'allonger la durée de conservation du lait, de donner aux produits une saveur plus agréable que le lait frais se fait de façon « artisanale », sans aucun contrôle sur les microorganismes qui en sont responsables. La pasteurisation, seul moyen capable de détruire les germes pathogènes susceptibles d'être présents dans le lait cru, est absente de la chaîne.

Pour améliorer la disponibilité et l'accessibilité du lait produit localement, plusieurs tentatives de mise en place d'un système de collecte de lait ont été testées sans trop de succès. Ce fut le cas entre autres de Nestlé qui avait installé en début des années 1990 un centre de collecte autour de la ville de Dahra mais ce centre de collecte a fermé en 2003. Parallèlement à ces initiatives basées sur la collecte réfrigérée, on assiste aujourd'hui à l'émergence d'entreprises de collecte et de transformation du lait aux dimensions plus modestes. Ces mini-laiteries semblent constituer un modèle beaucoup plus durable du développement de la filière lait locale (**Duteurtre *et al.*, 2010**).

Malgré ce dynamisme apparent de la filière lait, la contribution de la production locale à la satisfaction des besoins en lait et produits laitiers demeure faible. Ceci s'explique par les diverses contraintes auxquelles est confrontée la filière locale du lait au Sénégal.

4. Contraintes au développement de la filière locale du lait

Dans les systèmes de production extensif et semi-intensif, les contraintes à la production laitière sont représentées par les faibles performances des animaux de traite, l'insuffisance d'équipements et le faible niveau de technicité qui ne garantissent pas la qualité et la régularité du lait produit localement. Le manque d'infrastructures pour conserver ou acheminer le lait des zones de production vers les zones de consommation fait que le lait et les produits laitiers issus de la filière locale sont de qualité organoleptique inconstante et de qualité hygiénique médiocre (Seydi *et al.*, 1993 ; Min'la *et al.*, 2001).

Dans le système intensif, même si on fait appel aux génotypes importés dont les potentialités laitières sont importantes, la cherté des intrants alimentaires et médicamenteux augmente les coûts de production du lait. Le lait produit localement est alors fortement concurrencé par la poudre de lait importée.

En ce qui concerne les importations, la nouvelle taxation de la poudre de lait n'est pas non plus en faveur de l'émergence de la filière locale. En effet, jusqu'en 1999, une taxe douanière (coût assurance fret) de 29,6 % était appliquée à la poudre de lait importée, mais cette tarification a été modifiée suivant les dispositions arrêtées par l'UEMOA (Union économique et monétaire ouest-africaine). Ce système harmonisé en vigueur dans l'espace UEMOA, applique une taxe de 5 % pour les industriels contre 26 % pour les importateurs ordinaires. De ce fait, les produits laitiers issus de la transformation de la poudre de lait importée par les industriels de Dakar deviennent relativement moins chers que ceux issus de la transformation du lait frais produit localement.

Malgré toutes ces contraintes, la filière laitière locale n'est cependant pas en voie de disparition. Elle a même de beaux jours devant elle.

5. Opportunités au développement de la filière locale du lait

Au Sénégal, les atouts de l'élevage laitier sont liés au prestige de la possession du bétail et en particulier de la vache auquel s'ajoute l'image très positive véhiculée par le lait local. L'élevage du gros bétail a un poids économique et social important. En milieu rural, la vache est un bien précieux. Sa possession est une source de prestige et de reconnaissance sociale.

Le bétail représente une source alimentaire, une source d'engrais, une source de revenus et une garantie contre toutes sortes d'aléas. L'élevage des animaux laitiers constitue également une sécurisation et une fructification des fortunes de diverses origines. Dans la zone des Niayes, en périphérie de Dakar, les élevages intensifs sont des entreprises commerciales appartenant aux hommes d'affaires qui ont fait fortune dans les finances, ou à l'import-export, mais également des hauts fonctionnaires en fin de carrière internationale ou locale (**Sery, 2003**).

Sur le plan alimentaire, le lait de vache est l'un des traits majeurs de la civilisation pastorale sahélienne où le concept lait est l'un des principaux repères d'appartenance à l'ethnie peul. Dans les autres franges de la population sénégalaise, aussi bien en ville qu'à la campagne, le lait bénéficie d'une appétence particulière par les consommateurs de tout âge et de toute catégorie sociale. En zone d'élevage, le lait constitue la principale source de protéines animales. Près de 80 % du lait produit en milieu rural est destiné à l'autoconsommation (**Metzger et al., 1995**). Le lait est consommé frais, fermenté ou sous forme de beurre. De part sa texture, sa conservation relative et son goût acidulé, le lait fermenté est le produit laitier le plus apprécié. Il entre dans la composition de divers mets froids ou semi liquides à base de céréales locales. Coupé à l'eau et sucré, le lait fermenté devient une boisson très rafraichissante. Enfin dans la culture pastorale, une efficacité thérapeutique et esthétique particulière est attribuée au lait de vache.

V. IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES DES ALIMENTS

Depuis la découverte du premier microorganisme en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine van Leeuwenhoek jusqu'aux dernières puces à ADN, les méthodes d'identification bactérienne ont fortement évoluées. Pendant longtemps, les méthodes classiques (observation microscopique et isolement sur milieux de culture sélectifs), ont été les plus utilisées. Les microbiologistes ont ensuite franchi une étape, en faisant appel à l'analyse de la structure des composés cellulaires. Mais, c'est surtout grâce au progrès de la biologie moléculaire qu'il a été possible non seulement de clarifier la classification des microorganismes, mais aussi de les identifier de façon précise.

1. Taxonomie bactérienne

La taxonomie bactérienne se définit comme l'étude des relations qui existent entre les bactéries. Elle englobe la classification, la nomenclature et l'identification. Ces trois parties consistent respectivement à classer et à arranger les micro-organismes dans des groupes sur la base de similitudes, à donner des noms aux groupes trouvés et à identifier des entités inconnues pour déterminer s'ils appartiennent aux groupes déjà définis (**Grimont, 1998**). Pendant très longtemps, les microorganismes ont été classés selon leur structure cellulaire, en eucaryotes et procaryotes. Cette classification a évolué depuis pour aboutir à la constitution des cinq règnes du vivant : les procaryotes (bactéries principalement), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les champignons (eucaryotes multicellulaires), les plantes (eucaryotes multicellulaires) et les animaux (eucaryotes multicellulaires).

La taxonomie bactérienne a permis également de construire des échelons hiérarchisés au sommet desquels nous avons le règne puis viennent, l'embranchement, la classe, l'ordre, la famille, le genre et enfin l'espèce. L'espèce bactérienne se définit comme un groupe de souches d'origines différentes, provenant de nouveaux isollements ou de nouvelles collections, ayant en commun beaucoup de caractères mais différent des autres espèces au niveau phénotypique et génotypique (**Grimont, 1998**). De ce fait, on peut distinguer deux méthodes de taxonomie : les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques (moléculaires).

1.1. Taxonomie phénotypique

Chez les bactéries, la taxonomie phénotypique est basée sur des caractères morphologiques, culturels, physiologiques, biochimiques, métaboliques et immunologiques. Deux bactéries appartiennent à la même espèce lorsqu'elles partagent plusieurs de ces caractères. La taxonomie phénotypique présente de nombreuses limites dont le manque de fiabilité du fait de l'instabilité des caractères phénotypiques mais aussi de son faible pouvoir discriminant (**Euzéby, 2006**). Aujourd'hui, elle est remplacée par la taxonomie moléculaire.

1.2. Taxonomie moléculaire ou génotypique

La taxonomie moléculaire est basée, en priorité, sur l'étude des protéines et des acides nucléiques ribosomiaux, ADNr ou ARNr. Actuellement, plusieurs techniques sont disponibles pour étudier la diversité taxonomique des microorganismes.

1.2.1. Détermination du pourcentage guanine + cytosine (G+C p. cent ou % G+C)

L'ADN est le support de l'information génétique. La molécule d'ADN est une double chaîne de nucléotides reliés par les bases azotées selon les compatibilités suivantes: adénine (A)-thymine (T) et guanine (G)-cytosine (C). Dans toutes les molécules d'ADN, il existe autant de molécules de T que de A et autant de molécules de G que de C. C'est le grand principe de complémentarité selon lequel, à une adénine correspond toujours une thymine et à une cytosine vient toujours s'apparier une guanine. La détermination du % G+C est la méthode génotypique la plus simple. D'une manière générale, la variation du % G+C ne dépasse pas 3 % entre les individus d'une même espèce et pas plus de 10 % pour un même genre (**Stackebrandt et al., 1993**). Le % GC dans le monde bactérien varie entre 24 et 76 %. Il est aussi courant de classer les espèces bactériennes en deux groupes : les haut % GC (% GC supérieur à 55%) et les bas % GC (% G+C inférieur à 55 %) (**Tailliez et al., 2002**).

1.2.2. Hybridation ADN/ADN

Le pourcentage d'hybridation ADN/ADN et la baisse de la stabilité thermique de l'hybride sont utilisés pour décrire l'espèce (**Wayne et al., 1987**).

Deux organismes qui ont 70% d'homologie ADN présentent au moins 90% d'identité de séquence (**Stackebrandt et al., 1994**). D'une manière générale, les taxonomistes ont décidé que deux souches appartiennent à une même espèce, lorsque leurs ADN sont homologues à plus de 70%, avec une différence de température de demi dénaturation (ΔT_m) du double brin hybride d'au plus 5°C (**Tailliez et al., 2002**). La technique d'hybridation ADN/ADN suppose d'avoir une idée à priori de l'espèce à laquelle appartient la nouvelle souche à identifier, que cette dernière appartienne à une espèce déjà décrite et qu'elle soit cultivable. Ce qui constitue une limite.

1.2.3. Autres techniques basées sur la réaction de polymérase en chaîne (PCR)

1.2.3.1. Réaction de polymérase en chaîne (PCR), comme base des méthodes moléculaires

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une méthode d'amplification directe d'une séquence d'ADN, comprise entre deux régions s'hybridant chacune avec une amorce spécifique (**Saiki et al., 1985**). Cette technique repose sur la synthèse enzymatique d'ADN, par une ADN polymérase à partir de deux amorces de polarité opposée et dont la séquence est spécifique de chacune des bornes du fragment à amplifier. La synthèse de polynucléotides à partir des extrémités du fragment amplifié, génère des matrices qui peuvent à leur tour être recopiées, et conduire de cette manière à une population de molécules d'ADN dont la multiplication est exponentielle. Les éléments nécessaires à une réaction de PCR sont les suivants :

- une matrice d'ADN constituée par un brin parental ;
- des nucléotides propres à l'ADN et contenant le désoxyribose et des bases sous formes de nucléosides triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). L'ensemble de ces nucléotides est souvent nommé dNTPs ;
- une polymérase, le plus souvent la Taq, qui est une enzyme thermorésistante isolée de *Thermus aquaticus*, une bactérie qui se développe à haute température ;
- certains ions comme le Mg^{2+} ;
- un couple d'amorces composé d'une oligomère complémentaire de l'extrémité 3' du monobrin d'ADN à amplifier et d'un autre de l'extrémité 5' du brin antiparallèle.

Une réaction PCR comprend une répétition de cycles de transition de température, chaque cycle contenant 3 étapes qui sont la dénaturation, l'hybridation et l'extension ou élongation.

Les différentes étapes d'une PCR sont schématisées dans la figure 4.

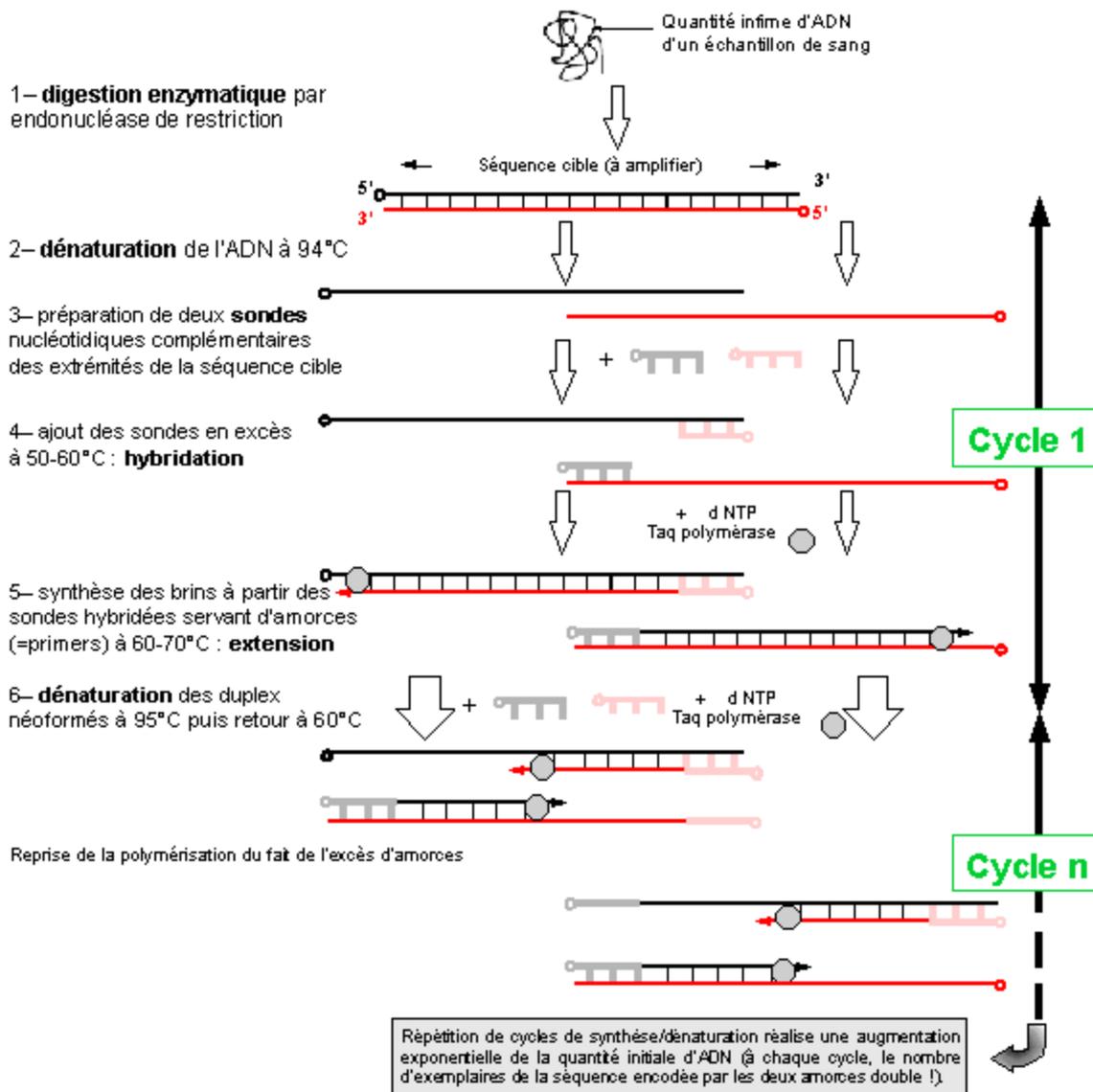


Figure 4 : Les différentes étapes d'une réaction de PCR classique (Anonyme 4, 2001)

Avant de commencer les cycles de PCR, une étape de chauffage est généralement nécessaire. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et éventuellement de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.

La dénaturation thermique de l'ADN matrice bicaténaire permet de séparer les deux brins complémentaires antiparallèles orientés 5'-3' et 3'-5'. L'hybridation consiste en l'appariement des deux amorces spécifiques complémentaires à chacun des deux brins de l'ADN matrice.

L'élongation se fait à partir des extrémités 3'OH libres des amorces par polymérisation enzymatique de précurseurs désoxyribonucléotides. La température d'hybridation, le temps d'élongation et les amorces dépendent de la taille du fragment à amplifier.

A partir des principes d'une réaction PCR classique, plusieurs techniques ont été développées. Parmi ces dernières, on peut citer les méthodes qui reposent sur l'emploi des enzymes de restriction et le séquençage des acides nucléiques.

1.2.3.2. Analyse de séquences ou séquençage

Le séquençage des acides nucléiques notamment les ADN ribosomiques (ADNr) permet d'identifier une espèce en comparant les séquences d'ADN obtenues après amplification puis clonage à celles de bases de données préexistantes. Les gènes rRNA (rDNA) sont universellement distribués, et généralement bien conservés, avec de plus ou moins grandes variabilités à différentes sections de la molécule (**Lane et al., 1985**). Les ARNr bactériens sont classés en fonction de leurs taux de sédimentation en centrifugation. Ainsi, au niveau du chromosome bactérien, on distingue les gènes 5S, 16S, et 23S. L'ARNr 16S est la plus petite sous-unité de ribosome. C'est la molécule qui a été la plus étudiée. Deux bactéries ayant des séquences d'ADN ribosomique 16S qui divergent de plus de 3% appartiennent à des espèces différentes (**Stackebrandt et al., 1994**). Les ARNr 16S et 23S se caractérisent par une alternance de domaines très conservés et de domaines hypervariables. Sur l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*, les régions conservées sont au nombre de dix et sont annotées de A à J. De ces régions peuvent être extraites des amorces ou sondes dites « universelles ». Entre ces régions conservées existent des régions dites « hypervariables » au nombre de neuf et notées de V1 à V9. La plus grande variation de séquence est observée dans la région V3 (**Lee et al., 1996 ; Neefs et al., 1993**).

1.2.3.3. Techniques reposant sur l'emploi d'enzymes

Les techniques qui reposent sur les enzymes de restriction comme l'AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) et la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) étudient la diversité moléculaire de souches au sein d'une même espèce alors que la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) permettent de séparer des souches d'espèces très proches.

L'ADN génomique est d'abord coupé à l'aide d'enzymes de restriction puis séparé par des techniques électrophorétiques à savoir, l'électrophorèse classique sur gel d'agarose ou d'acrylamide et l'électrophorèse en champs pulsés pour la PFGE. Ces techniques sont assez simples à mettre en œuvre une fois les souches isolées. Elles sont d'ailleurs de plus en plus utilisées en épidémiologie moléculaire (**Tailliez *et al.*, 2002**).

2. Etude des micro-organismes du lait et des produits laitiers

Comme nous l'avons vu plus haut, certains microorganismes du lait, notamment les bactéries lactiques ont de nombreuses propriétés métaboliques que les industriels et les nutritionnistes cherchent à valoriser. D'autres bactéries du lait ont un intérêt en santé publique ; sécurité des produits lesquels ne doivent pas contenir des germes potentiellement pathogènes ou dans la salubrité (germes d'altération). Pour tirer le meilleur parti des microorganismes du lait, il est donc nécessaire d'avoir une technique d'identification et de différenciation aussi précise que possible des espèces constitutives des écosystèmes laitiers.

2.1. Méthodes traditionnelles

Traditionnellement, le suivi des microorganismes des laits et produits laitiers se fait par une approche classique qui allie à la fois les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des colonies isolées sur milieux de culture. Même si ces méthodes ont permis d'identifier la plupart des microorganismes présents dans les laits, les limites de ces méthodes dites « culture-dépendantes » sont désormais bien connues. En effet, elles ne donnent qu'une pâle idée des populations microbiennes car une souche répond différemment aux tests phénotypiques suivant son stade de croissance et les conditions de culture. Il existe également des biais liés à la non-cultivabilité ou à la perte de cultivabilité de certaines souches et à l'identification de souches ayant des caractéristiques morphologiques proches. A cela s'ajoute la sélectivité des milieux de culture, la méconnaissance *a priori* de toute la microflore et *a fortiori* le moyen de cultiver toutes ses espèces. Le passage par une étape de culture favorise également les espèces les mieux adaptées aux conditions de croissance. Ce qui entraîne, dans la plupart des cas, une sous estimation de la diversité microbienne (**Amann *et al.*, 1995 ; Masco *et al.*, 2005**). Ces méthodes sont également longues, fastidieuses et coûteuses. Toutes ces limites et biais plaident en faveur de l'utilisation des outils moléculaires.

2.2. Nouvelles approches moléculaires

A partir des principes d'une réaction PCR classique, plusieurs techniques ont été développées pour discriminer et/ou identifier les micro-organismes des écosystèmes complexes comme c'est le cas des produits laitiers. Ces méthodes peuvent être scindées en deux groupes. Le premier groupe comprend les méthodes permettant de faire une identification globale de toutes les espèces présentes et le second permet de détecter une espèce particulière.

2.2.1. Identification globale des espèces présentes dans une matrice laitière

Les méthodes d'identification globale des espèces présentes dans une matrice laitière comprennent les inventaires moléculaires et les techniques électrophorétiques. Ces dernières se différencient d'une part en électrophorèse en condition non dénaturante, c'est le cas de la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length), et d'autre part en électrophorèse en conditions dénaturantes dont les plus connues sont la TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) ou gradient dénaturant de température et la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou (gradient dénaturant chimique) (Tailliez *et al.*, 2002).

2.2.1.1. Analyse de fragments : la SSCP

L'analyse par SSCP repose sur le comportement électrophorétique d'un fragment d'ADN simple brin dans un gel de polyacrylamide. Après l'amplification par PCR des acides nucléiques totaux, ces derniers sont dénaturés en ADN simple brin puis déposés sur gel de polyacrylamide. Une communauté microbienne est représentée par un profil de pics correspondant à une séquence. L'aire de chaque pic donne une indication sur l'abondance du micro-organisme au sein de la communauté (Bonaïti, 2004 ; Duthoit *et al.*, 2003 ; Tailliez *et al.*, 2002).

2.2.1.2. T-RFLP

La T-RFLP est une méthode d'identification des espèces basée sur un polymorphisme de restriction. Elle consiste à hydrolyser par des enzymes de restriction des séquences d'ADN amplifiées par PCR.

L'amplification est réalisée avec des amorces universelles dont une est marquée en 5' par un fluorochrome. Le produit PCR obtenu est ensuite digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction, générant des fragments de diverses longueurs selon la séquence de l'ADN et la spécificité de l'enzyme. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués avec le fluorochrome sont visualisés et mesurés par un séquenceur automatique. C'est une technique sensible et rapide permettant d'accéder rapidement à la diversité microbienne de différents environnements (Marsh, 1999).

2.2.1.3. Electrophorèses en conditions dénaturantes : TTGE et DGGE

Le principe d'une séparation de fragments d'acides nucléiques sur un gel d'électrophorèse avec gradient dénaturant est basé sur une perte différentielle de leur vitesse de migration dépendante de leur température de $\frac{1}{2}$ dénaturation. La dénaturation progressive des fragments d'ADN au fur et à mesure de leur progression dans le gel entraîne une nouvelle conformation ouverte des molécules qui ralentit leur migration (Muyzer, 1999 ; Ogier *et al.*, 2002). L'ajout d'une répétition de bases guanine et cytosine (*GC clamp*) sur l'extrémité 5' de l'une des amorces permet d'éviter la dénaturation totale des produits PCR. Compte tenu de la composition de cette séquence GC, son T_m , très élevé, prévient toutes possibilités de dénaturation complète du fragment amplifié (Myers *et al.*, 1985). Dans le cas de la TTGE, les amplicons vont être séparés par un gradient linéaire croissant de température alors que pour la DGGE, c'est plutôt un gradient chimique urée/formamide.

L'un des avantages des techniques TTGE et DGGE est que l'on peut découper les bandes d'intérêt, les amplifier par PCR et effectuer un séquençage des bandes individuelles d'ADN pour accéder directement à l'identification des micro-organismes par interrogation des bases de données (Ogier *et al.*, 2002 ; 2004). Cependant, des limites, contraintes et biais ont été également observés lors de l'utilisation des méthodes TTGE et DGGE. Outre les biais pouvant être engendrés par l'extraction d'ADN total, les étapes de choix des amorces et d'amplification par PCR sont fondamentales (Ercolini, 2004, Giraffa et Neviani, 2001). Généralement, sur les gels TGGE et DGGE, chaque bande correspond à une espèce. Cependant, il arrive qu'une bande soit assignée à deux ou plusieurs espèces ou qu'une espèce soit représentée par une double bande. La co-migration d'espèces différentes peut s'expliquer par le fait que ces dernières ont la même température de demi-dénaturation bien qu'ayant des séquences différentes.

Les profils multi-bandes sont dus au fait que certaines espèces présentent un polymorphisme entre les différents opérons dans la région de l'ADNr ciblée pour l'amplification (**Ercolini, 2004 ; Giraffa et Neviani, 2001 ; Henri-Dubernet *et al.*, 2004**). Enfin, les techniques TTGE et DGGE ne permettent d'identifier que les espèces majoritaires. Pour qu'une espèce sous-dominante soit amplifiée, il faut qu'elle représente plus de 1 % des espèces les plus dominantes (**Muyzer *et al.*, 1999 ; Ogier *et al.*, 2002**).

2.2.2. Détection des espèces particulières dans une matrice laitière

Les méthodes de détection d'une espèce spécifique nécessitent bien entendu d'avoir non seulement la connaissance de ce qu'on cherche mais aussi de pouvoir les retrouver. Parmi ces méthodes, on peut citer l'hybridation *in situ*, l'hybridation sur membrane et les PCR spécifiques.

2.2.2.1. Hybridation *in situ* ou méthode FISH

L'hybridation *in situ* ou méthode FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) permet l'identification d'une cellule placée dans son environnement par l'utilisation de sondes fluorescentes, complémentaires d'une séquence d'ADN spécifique de l'espèce recherchée (**Tailliez *et al.*, 2001**). Les sondes sont mises au contact des cellules et viennent s'hybrider spécifiquement à leur région homologue sur l'ADN. Après excitation des marqueurs fluorescents, les cellules sont visualisées par microscopie à épifluorescence ou détectées par cytométrie en flux (**Amann *et al.*, 1995 ; Wagner *et al.*, 2003**). La FISH a été utilisée pour identifier et quantifier différentes espèces de bactéries lactiques en mélange dans des laits fermentés ou des levains (**Matte-Tailliez *et al.*, 2001**).

2.2.2.2. Hybridation sur membrane

La technique d'hybridation sur membrane nécessite au préalable une extraction des acides nucléiques suivie d'une dénaturation et d'une fixation sur membrane. Cette technique suppose d'avoir un minimum de connaissances de l'espèce ou groupe d'espèces ciblées de manière à synthétiser une sonde spécifique, complémentaire d'une séquence d'ADN de l'espèce. Les sondes utilisées sont marquées par des molécules radioactives ou des systèmes non radioactifs comme des enzymes ou des molécules fluorescentes (**Denis *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2001**).

2.2.2.3. PCR spécifiques

Les PCR spécifiques sont basées sur l'amplification d'une région spécifique d'une espèce donnée. C'est un héritage de la technique d'hybridation ADN/ADN. Elles sont intéressantes pour identifier très rapidement des souches d'espèces pour lesquelles il n'existe pas de caractères d'identification simples et fiables (**Cibik *et al*, 2000**).

Chapitre 2
MATÉRIEL ET MÉTHODES

SCHÉMA GÉNÉRAL DE L'APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE

Pour la réalisation des travaux de cette thèse, nous avons adopté une approche méthodologique qui allie à la fois les méthodes descriptives par les enquêtes de terrain et les méthodes analytiques par les analyses de laboratoire. La figure 5 présente sous forme de schéma la méthodologie générale d'approche.

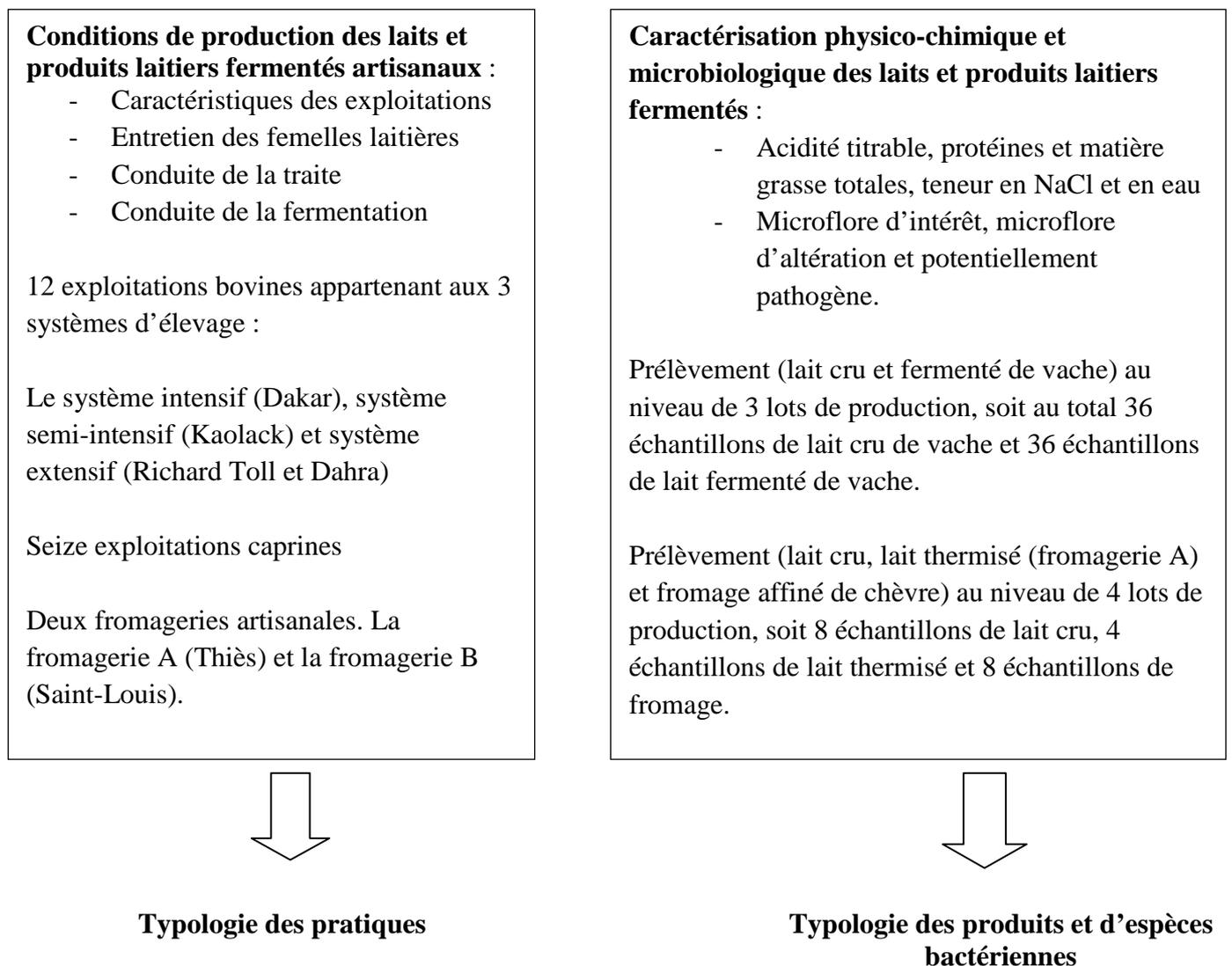


Figure 5 : Schéma d'approche méthodologique

I. CONDITIONS DE PRODUCTION DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS FERMENTES DANS LES ELEVAGES ET ATELIERS FERMIERS SUIVIS

Le volet enquête de terrain avait pour but de décrire les paramètres de production des laits crus de vache et de chèvre ainsi que de leurs produits de fermentation, essentiellement laits fermentés de vache et fromages de chèvre. Au cours de ces enquêtes, les races exploitées pour la production laitière, les conditions de logement, les stratégies alimentaires, l'hygiène générale dans les étables et l'hygiène de la traite ont été appréciées. De même, les procédés de fermentation du lait ont été décrits.

1. Choix des exploitations suivies

Le travail de terrain a été mené dans 12 élevages bovins et dans deux ateliers fromagers. Les élevages bovins ont été choisis dans les trois systèmes d'élevage habituellement décrits au Sénégal et qui correspondent aux différentes zones éco-géographiques. Ces systèmes sont le système pastoral de type extensif, le système semi-intensif et le système intensif. Ce choix se justifie par la diversité des systèmes d'élevage et des climats qui pourrait influencer les techniques de fermentation et les microflores impliquées dans ces fermentations.

Dans chaque système d'élevage, quatre exploitations ont été choisies. Ce choix a été orienté avec deux critères d'inclusion communs aux douze exploitations ; une production continue sur toute l'année et la fermentation spontanée du lait. D'autres critères comme la taille du troupeau et les quantités de lait produites ont été également pris en compte, mais à des niveaux différents pour les trois systèmes. La taille du troupeau devait être de plus 50 vaches pour les systèmes intensifs et extensifs et d'au moins 5 pour le système semi-intensif. La production laitière devait être au moins de 250 L/j pour le système intensif et de 10 L/j pour les deux autres systèmes. Enfin, l'aspect « genre » a également prévalu au choix des exploitations pour pouvoir prendre en compte l'engagement des femmes dans la filière laitière et en particulier dans la chaîne de valeur ajoutée. C'est ainsi que sur les douze exploitations suivies, quatre étaient gérés par les femmes (2 à Kaolack et 2 à Dahra). Les autres exploitations bovines suivies sont situées dans la région de Dakar (4), dans la région de Kaolack (2) et dans la région de Saint-Louis (2).

Pour la production du lait et de fromages de chèvre, deux fromageries sur les cinq que compte le pays avaient une production régulière au moment de l'étude. Il s'agit de la fromagerie A située dans la région de Thiès et de la fromagerie B située dans la région de Saint-Louis. Les élevages et ateliers fermiers suivis dans cette étude sont matérialisés sur la figure 6.

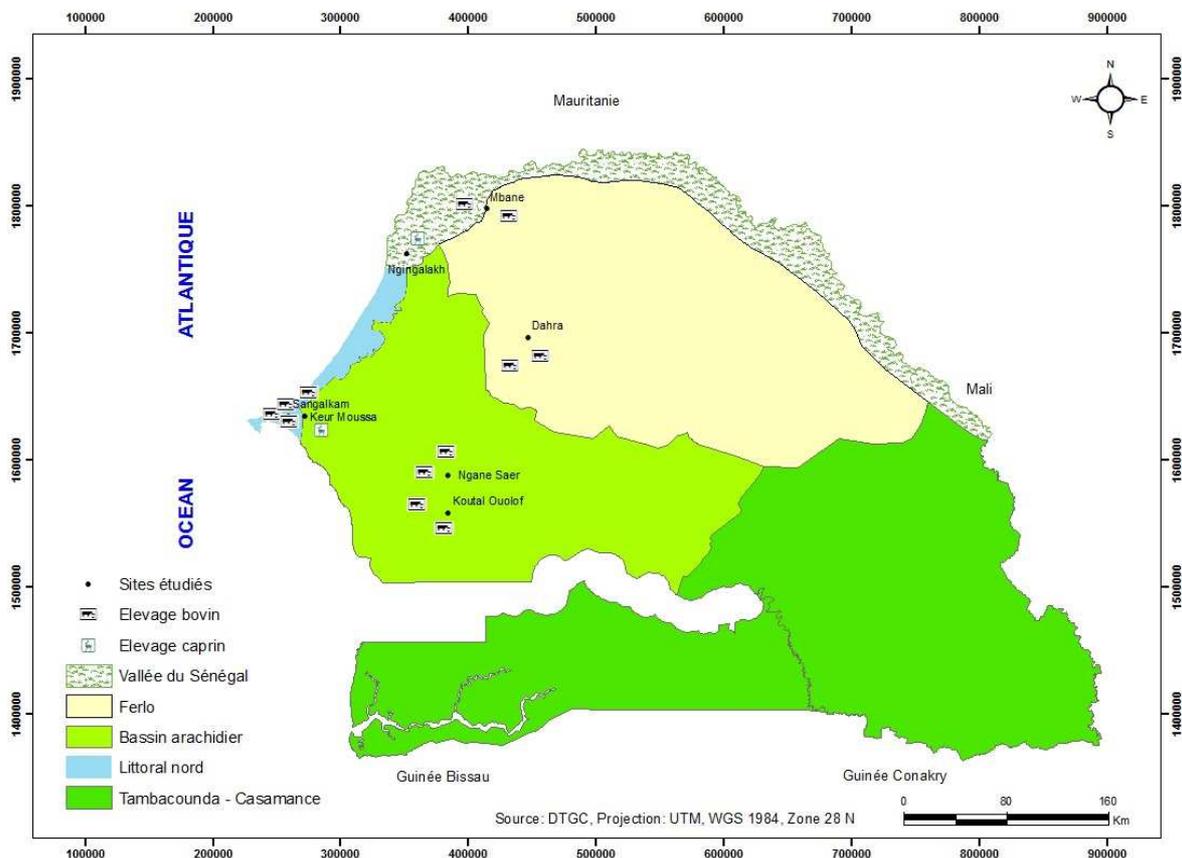


Figure 6 : Carte du Sénégal indiquant la situation géographique des exploitations et ateliers fermiers suivis dans cette étude

2. La conduite des enquêtes

Les enquêtes ont été conduites pendant trois mois, de janvier à mars 2008. Au préalable, un accord avec l'éleveur pour le suivi de son troupeau et de l'activité de transformation du lait avait été acquis. Pour la caractérisation des pratiques d'élevage des femelles laitières, des pratiques autour de la traite et de la transformation du lait, nous avons fait appel à des outils empruntés des sciences sociales : l'observation désengagée et les entretiens de groupe. A cet effet, une fiche d'enquête a été élaborée (**annexe 1**). L'observation désengagée est utilisée lorsque les phénomènes que l'on cherche à décrire peuvent être constatés ou observés sans qu'il soit nécessaire de connaître comment ils sont vécus de l'extérieur.

Plusieurs séances ont été nécessaires pour éviter que notre présence influence la manière habituelle d'exécuter les tâches pour lesquelles l'intéressé était observé.

En plus de l'observation désengagée, pour diversifier les opinions et trianguler les informations sur les systèmes de production et de transformation du lait, d'autres outils tels que les entretiens de groupes appelés communément « *focus group* » ont été utilisés. Dans chaque localité, 2 groupes de discussions d'une heure environ chacun ont été conduits. Le nombre de participants était de 5 à 6 personnes. La sélection des participants a été basée sur le fait d'exercer l'activité d'élevage et/ou de transformation du lait. Toutes les personnes répondant à ce critère ont été approchées en vue de les convaincre pour participer aux groupes de discussion. La contrainte majeure a été la disponibilité de ces personnes. Dans bien des cas, les réunions ont été tenues dans la soirée, après les travaux ménagers et hors ménages.

II. RECHERCHE ET LE DENOMBREMENT DES FLORES PAR LES METHODES CULTURALES

La recherche et les dénombrements microbiens ont été faits selon les protocoles normalisés (FIL ou ISO). Les milieux appropriés à chaque groupe de bactéries disponibles dans le commerce ont été utilisés. Le dénombrement de la microflore d'intérêt technologique a concerné les 4 groupes de bactéries lactiques habituellement isolés des laits et des produits laitiers : *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. et *Enterococcus* sp. Le dénombrement des germes d'altération a concerné la flore totale mésophile uniquement dans les laits crus. La recherche ou le dénombrement des germes potentiellement pathogènes ont été réalisés pour tous les échantillons et a concerné *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. et les staphylocoques à coagulase positive.

1. Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué des échantillons de lait cru de vache et de chèvre, de laits fermentés de vache et de fromages de chèvre provenant des fermes et ateliers fermiers localisés dans les régions de Dakar, Thiès, Kaolack, Saint-Louis et Louga.

2. Méthodes

1.1. Echantillonnage

1.1.1. Echantillons de lait cru de vache

Les prélèvements des laits crus de vache ont été réalisés entre janvier et mars 2008 dans 12 exploitations appartenant aux trois systèmes d'élevage (intensif, semi-intensif et extensif) décrits plus haut. Pour nous assurer de la stabilité des écosystèmes et de la constance de la qualité, dans chaque exploitation, les échantillons ont été prélevés au niveau de 3 lots de production successifs, avec un intervalle de 30 jours, soit 3 prélèvements par exploitation. Au total, 36 échantillons de lait cru de mélange de la traite du matin ont été prélevés au niveau des tanks de refroidissement et/ou des ustensiles de traite et ce dans un délai n'excédant pas 30 minutes après la fin de la traite. Un échantillon de lait équivaut à environ 500 mL de lait cru prélevés à l'aide des outils de la fermière ou du fermier.

Mis dans des bocaux stériles, ces échantillons ont été transportés dans une glacière contenant de la glace (température $\leq +4^{\circ}\text{C}$) jusqu'à l'arrivée au laboratoire où chaque échantillon a été divisé aseptiquement en trois fractions. La première fraction a servi aux analyses physico-chimiques, la seconde à la caractérisation phénotypique des microflores et la dernière a été utilisée pour la caractérisation moléculaire des communautés bactériennes présentes. Les analyses de microbiologie classique ont été faites sans délai. Les deux autres fractions d'échantillons ont été congelées et conservées à -20°C pour les analyses ultérieures. La durée de conservation était d'environ une semaine.

1.1.2. Echantillons de lait fermentés de vache

Vingt quatre heures après le prélèvement du lait cru, nous repassons systématiquement dans chaque exploitation pour prélever le lait fermenté. Les laits fermentés sont donc issus des laits crus prélevés la veille. Le protocole de prélèvement a été le même que pour le lait cru. Au total, 36 échantillons de laits fermentés de vache ont été prélevés.

1.1.3. Echantillons de lait cru et thermisé de chèvre

Dans chaque fromagerie, 4 suivies de fabrications fromagères ont été réalisées. Ainsi, 4 échantillons de lait de mélange de la traite du matin (fromagerie A) et 4 échantillons d'une traite biquotidienne (soir et matin) pour la fromagerie B, soit 8 échantillons de lait cru de chèvre ont été prélevés. Pour fromagerie A où le lait était thermisé par chauffage au bain marie, après la collecte, les prélèvements ont été effectués après ce traitement thermique, soit 4 échantillons de lait thermisé. Comme pour les laits crus de vache, un échantillon de lait cru de chèvre équivaut à 500 mL de lait prélevés juste avant le début des fabrications. Ces échantillons ont été transportés dans les mêmes conditions que celles déjà décrites (**paragraphe 2.1.1**). Au laboratoire ils ont été également traités comme décrits précédemment, c'est-à-dire que chaque échantillon a été divisé en trois fractions pour servir aux analyses de microbiologie classique, de microbiologie moléculaire et de physico-chimie.

1.1.4. Echantillons de fromage de chèvre

Pour les 4 fabrications suivies, à la fin du processus d'affinage, les fromages ont été prélevés au niveau de chaque lot de fabrication.

Un échantillon de fromage est constitué de trois unités de vente, d'un poids moyen de 120 g. Mis dans des bocaux stériles, les fromages ont été transportés dans une glacière contenant de la glace (température $\leq +4^{\circ}\text{C}$) jusqu'au laboratoire où les trois fromages ont été mélangés aseptiquement (broyage de 30 secondes dans des sachets stomacherND stériles) afin de constituer une unité d'analyse homogène. Par la suite, l'échantillon ainsi obtenu a été divisé aseptiquement en trois fractions pour servir aux analyses de microbiologie classique, de microbiologie moléculaire et de physico-chimie.

2.2. Dénombrement des bactéries lactiques

Les lactocoques ont été dénombrés sur la gélose M17 (Difco, Elancourt, France) incubée à 30°C en anaérobiose pendant 24 h. Les lactobacilles mésophiles ont été dénombrés sur la gélose MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe, Difco) incubée à 30°C en anaérobiose. Les lactobacilles thermophiles ont été dénombrés dans les mêmes conditions que les lactobacilles mésophiles à la seule différence que les boîtes ont été incubées à 45°C . L'anaérobiose a été réalisée par incubation des boîtes dans une jarre contenant un générateur de gaz carbonique. Les leuconostocs ont été dénombrés sur la gélose MRS à laquelle ont été ajoutés 50 mg/L de vancomycine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). L'incubation a été faite à 30°C pendant 72 h. Enfin, les entérocoques ont été dénombrés sur la gélose de Slanetz Bartley (Merck, Darmstadt, Allemagne) incubée à 44°C pendant 48 h.

2.3. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

La flore totale aérobie mésophile a été dénombrée selon la norme ISO 4833-2003. Le milieu de culture utilisé est le Plate Count Agar (PCA ; Biokar Diagnostics, Beauvais, France) additionné de 1 % de lait écrémé stérile. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 72 h.

2.4. Dénombrement d'*Escherichia coli*

Le dénombrement des *E. coli* β -glucuronidase positive a été fait suivant la norme ISO 16649-2, 2001. Le milieu de culture est la gélose TBX (Biokar) incubée à 44°C pendant 24 h.

2.5. Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Les staphylocoques ont été dénombrés sur le milieu de Baird Parker (Biokar) supplémenté avec le jaune d'œuf et le tellurite de potassium puis incubé à 37°C pendant 48 heures (norme NF V 08-057-1). L'identification des staphylocoques présumés pathogènes, donc à coagulase positive, s'est faite à la lumière des tests de confirmation tels que le test à la catalase et la recherche de la coagulase. La recherche de la catalase a été faite par l'émulsion des colonies caractéristiques (colonies noires, brillantes, convexes et entourées d'un halo clair) dans une goutte d'une solution de peroxyde d'oxygène déposée préalablement sur une lame. Le test est considéré comme positif quand il y a production de bulles d'air. La confirmation s'est poursuivie par la recherche de la coagulase. Les colonies caractéristiques ont étéensemencées dans 10 mL de bouillon cœur-cervelle (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 20 à 24 h. La recherche de la coagulase libre s'est effectuée dans un tube à hémolyse dans lequel a été introduit 0,1 mL de chaque culture provenant du bouillon cœur-cervelle et 0,3 mL de plasma de lapin. Une première lecture a été faite après une incubation de 4 à 6 heures à 37°C. En absence de coagulation, les tubes ont été ré-incubés pendant 24 h pour une seconde lecture. Le résultat est positif lorsque le coagulum occupe $\frac{3}{4}$ du volume initial.

2.6. Recherche des salmonelles

Les salmonelles ont été recherchées dans 25 g de produit en suivant la norme ISO 4833-2003. Une première étape de pré-enrichissement a été effectuée dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée (Merck) incubée à 37 °C pendant 24 heures. Une deuxième étape d'enrichissement sélectif a été réalisée à partir du bouillon d'enrichissement en ensemençant 10 mL de Rappaport-Vassiliadis (RV, Merck) par 0,1 mL de la culture précédente. Les tubes ont été ensuite incubés à 42 °C pendant 24 h.

L'isolement sélectif a été fait sur les géloses Rambach (Merck) et Muller Kauffman au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) incubées à 37°C pendant 24 h. Les colonies caractéristiques ont été purifiées sur la gélose nutritive (GN) incubée à 37°C pendant 24 h. La recherche de l'oxydase a été faite à la sortie des boîtes de l'étuve en déposant une colonie

isolée sur un disque imprégné d'oxalate de diméthylparaphénylène diamine. Le résultat est positif lorsque le disque change de couleur et devient violet.

Les colonies oxydase négative ont servi à l'ensemencement d'une galerie API 20 E (Biomérieux). Après 24 h d'incubation à 37°C, a lieu la lecture et l'identification à l'aide d'un catalogue analytique.

2.7. Recherche de *Listeria monocytogenes*

La recherche de *Listeria monocytogenes* a été faite dans 25 g d'échantillon selon la norme ISO 11290-2004. Le pré-enrichissement a été effectué dans 225 ml de bouillon Fraser ½ (Biomérieux) incubé à 30°C pendant 24 h. L'enrichissement a été fait par l'inoculation de 0,1 mL de la culture précédente dans 10 mL de bouillon Fraser complet (Biomérieux) incubé à 37°C pendant 48 h. L'isolement sélectif a été fait sur deux géloses. La gélose listeria selon Ottaviani et Agosti (ALOA, Biomérieux) et la gélose Palcam (Biomérieux) incubées à 37 °C pendant 24 h.

III. ETUDE DE LA BIODIVERSITE DES LAITS ET FROMAGES ANALYSES PAR LES METHODES MOLECULAIRES

En complément aux méthodes de culture bactérienne, les outils d'écologie moléculaire notamment la PCR-TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) et la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ont été utilisés pour l'identification précise des bactéries lactiques. Le choix des méthodes PCR-TTGE et PCR-DGGE est motivé par le fait que ces dernières ont déjà fait les preuves dans l'étude la biodiversité bactérienne des produits laitiers fermentés (Cocolin *et al.*, 2001 ; Ercolini, 2004 ; Henri-Dubernet *et al.*, 2004 ; Muyzer, 1999 ; Ogier *et al.*, 2002 ; 2004).

Les PCR spécifiques ont été utilisées pour les espèces sous-dominantes (< 1% de la population totale) comme *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Enfin, le séquençage a été utilisé pour l'identification des bandes assignées à des espèces inconnues à la base de données des référentiels TTGE et DGGE.

1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué des échantillons de lait cru de vache et de chèvre, de lait fermenté de vache et de fromages de chèvre ainsi que des souches de référence.

1.1. Echantillons de lait cru et fermenté de vache

Les échantillons de laits crus et fermentés de vache ayant servi à l'étude de la microflore par les méthodes moléculaires sont ceux qui avaient été congelés (partie II, paragraphe 2.1.1 pour les laits crus et 2.1.2 pour les laits fermentés). Cependant, compte tenu de la lourdeur des méthodes TTGE et DGGE et de leur niveau de précision, au moins un échantillon par exploitation a été retenu, sur la base de la qualité du culot cellulaire (culot propre) obtenu après la digestion enzymatique des matières grasses et protéiques du lait. Ainsi, 12 échantillons de laits crus de vaches et 12 échantillons de laits fermentés ont servi à l'identification moléculaire des bactéries lactiques. Pour les espèces potentiellement pathogènes, les échantillons analysés ont été ceux où la présence des espèces potentiellement pathogènes avait été mise en évidence par les méthodes de microbiologie classique.

1.2. Echantillons de laits crus et de fromages de chèvre

Compte tenu de leur nombre relativement faible, tous les échantillons de lait cru et fromages de chèvre où la digestion des matières protéiques et grasses avait été bonne ont été analysés. Comme pour les laits de vache, tous les échantillons où des germes potentiellement pathogènes avaient été mis en évidence par les méthodes de microbiologie classique ont fait l'objet de test de PCR spécifiques.

1.3. Souches de référence

Les souches de référence utilisées dans cette étude proviennent de la collection du CNRZ (Centre National de Recherches Zootechniques) de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Jouy-en-Josas. Pour les espèces bas % GC (visualisées sur le gel TTGE), les 4 souches de référence ci-après ont servi à la standardisation des distances de migration :

- ✚ *Lactococcus garvieae* CNRZ 1323 ;
- ✚ *Lactococcus raffinolactis* CNRZ 1214 ;
- ✚ *Enterococcus faecalis* CE 17 ;
- ✚ *Lactococcus lactis ssp lactis biov.diacetylactis* CNRZ 1260.

Le marqueur DGGE contient les 6 souches de référence ci-après :

- ✚ *Bacillus pumilus* ATCC 7725 ;
- ✚ *Klebsiella oxytoca* ATCC 103434T ;
- ✚ *Kytococcus sedentarius* CNRZ 880T ;
- ✚ *Arthrobacter citreus* CNRZ 928T ;
- ✚ *Kocuria kristinae* CNRZ872 ;
- ✚ *Propionibacterium jensenii* Z87.

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'ADN génomique

Après la décongélation des échantillons toute une nuit à +4°C, l'ADN bactérien a été extrait directement de sa matrice laitière (lait cru, lait fermenté et fromage).

La première étape a consisté en une digestion des protéines du lait à l'aide d'une solution de

pronase à 12,5 mg/mL (Roche Diagnostics, Meylan, France) et de β -mercaptoéthanol (Serva, Heidelberg, Allemagne). La pronase est un mélange de protéases isolées du liquide extracellulaire de *Streptomyces griseus*. Elle est capable de digérer les protéines presque complètement en acides aminés. Quant au β -mercaptoéthanol, c'est un agent réducteur qui permet de rompre tous les ponts disulfures contenus dans les protéines. Selon le type d'échantillon (lait ou fromage), la digestion a été effectuée comme suit :

- A 35 mL lait sont ajoutés 4 ml d'une solution de pronase à 12,5 mg/ mL et 100 μ L de β -mercaptoéthanol à 10% (p/v)
- 5 g de fromage sont dilués dans 30 mL d'une solution de tri-sodium citrate à 2% p/v) (Merck, Eurolab, Fontenay-sous-bois, France) autoclavée. Le mélange est broyé à l'aide d'un ultra-turrax (T25 basic IKA, Labo Moderne, Paris, France) puis 4 mL de pronase à 12,5mg/mL et 100 μ L de β -mercaptoéthanol sont ajoutés.

Le mélange échantillon/pronase/ β -mercaptoéthanol a été incubé pendant 3h dans un bain marie à 52°C. A la fin de la digestion, lorsque les échantillons ont été bien clarifiés, ils ont été centrifugés (centrifugeuse SERVALL RC 5C PLUS), pendant 20 min à 9500 g à 4°C. Le surnageant est éliminé par retournement et la matière grasse enlevée à l'aide d'une spatule. Les culots cellulaires sont repris dans 500 μ L de tampon TES (Tris EDTA : 10 mL/L ; Saccharose : 250 g/L). L'EDTA a pour rôle d'inhiber les DNAses présentes dans le milieu, alors que le saccharose permet de maintenir une bonne pression osmotique. Le mélange tampon TES et culot cellulaire a été placé dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5mL et centrifugé 20 min à une vitesse de 13500 g à +4°C. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé par retournement et le culot cellulaire repris puis re-suspendu dans 50 μ L de tampon TES. Dix sept microlitres de cette solution ont été ensuite déposés sur des membranes FTA (Whatman®, Maidstone, Royaume-Uni) qui ont servi de matrice pour les PCR.

Le procédé FTA utilise des cartes imprégnées avec une formule chimique brevetée et sur lesquelles on dépose une petite quantité d'extrait d'ADN en solution sous forme de spots. La formule chimique imprégnée dans les cartes FTA lyse la membrane cellulaire bactérienne et dénature les protéines. Les acides nucléiques alors extraits, sont enchâssés et protégés dans les fibres de la matrice pour un stockage à température ambiante. Lorsque les cartes ne sont pas directement utilisées, elles sont gardées dans une enveloppe fermée à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Au moment de la réalisation des PCR, un disque de 0,2 mm de diamètre a été prélevé à

l'emporte-pièce sur la carte FTA puis lavé pendant 3 minutes à l'aide de 100 μL d'un réactif de purification FTA. Après l'élimination de la totalité du réactif FTA par pipetage, le disque a été rincé par deux lavages successifs de 3 minutes chacun avec de l'eau stérile, puis séché près de la flamme. Le disque sec est ainsi prêt à être analysé comme s'il s'agissait d'une solution d'ADN classique. Le schéma d'extraction des ADN totaux par le procédé FTA est matérialisé par la figure 7.

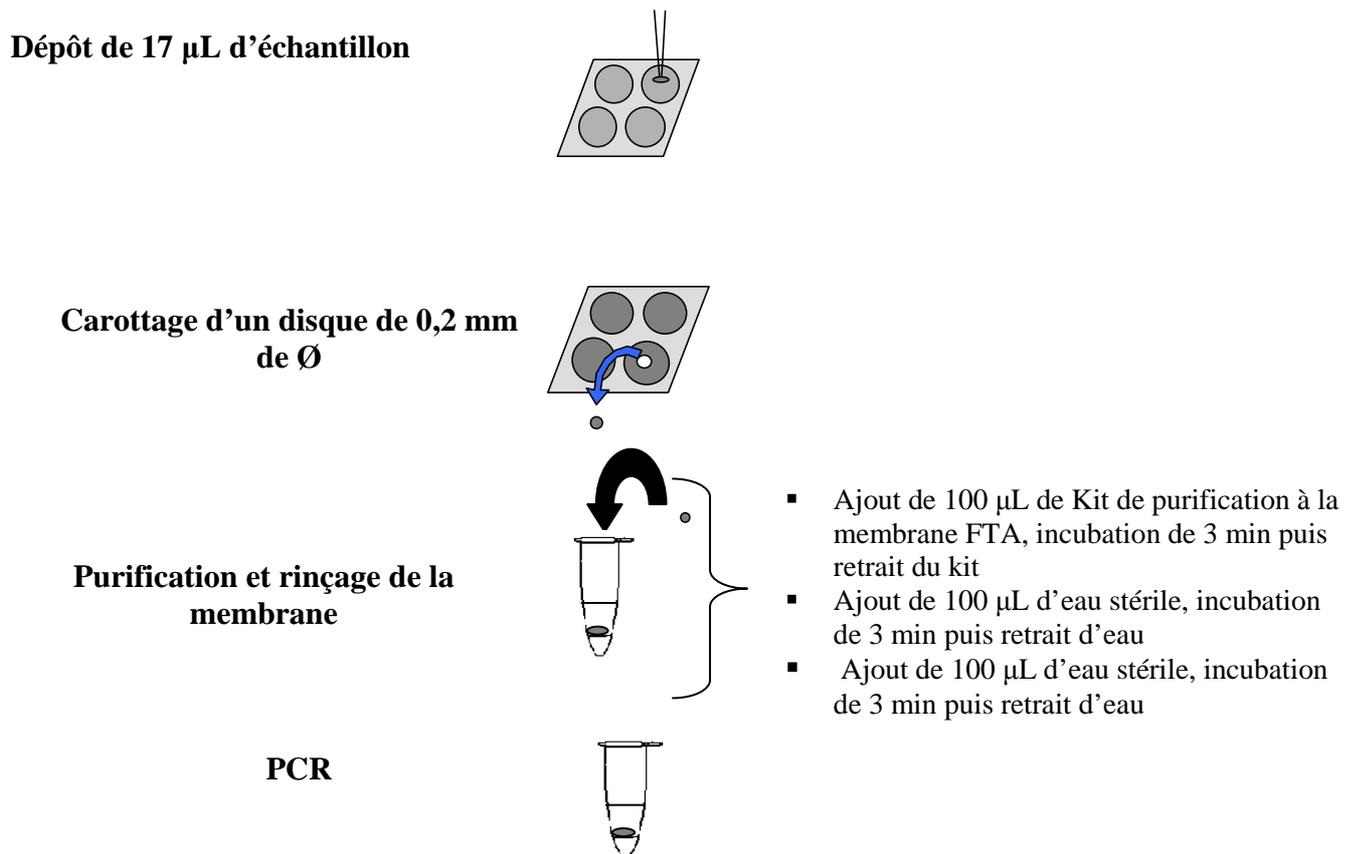


Figure 7 : Schéma d'extraction des ADN totaux par le procédé FTA

2.2. Amplification par PCR des extraits d'ADN (ADNr 16S puis fragment V3)

Pour l'amplification des extraits d'ADN, nous avons utilisé la PCR emboîtée ou Nested PCR qui est une méthode de PCR en deux étapes avec deux couples d'amorces différents, le second liant les séquences situées à l'intérieur du premier amplicon. La première PCR a permis d'amplifier une région conservée de l'ADNr 16S sur environ 700 paires de bases en utilisant des amorces universelles, W01 et W012 (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Allemagne).

Le volume réactionnel, de 50 μL comprenait :

- un patch FTA de 0,2 mm, assimilé à 1 μL d'ADN ;
- 0,5 μL de l'amorce W01 à 60 μM ;
- 0,5 μL de l'amorce W012 à 60 μM ;
- 1 μL de BSA (sérum albumine bovine (Euromedex, Mundolsheim, France), solution à 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;
- 0,5 μL de Taq polymérase à 5 U/ μL (Q-Biogène, Illkrich, France) ;
- 47,75 μL d'une solution composée de 1,5 μM de MgCl_2 et de 200 μM de chaque dNTP (ATP, dCTP, dGTP, dTTP (Q-Biogène).

Le BSA est un adjuvant utilisé pour optimiser des PCR sur les matrices riches en bases G+C et donc difficiles à dénaturer. Il a été utilisé pour des concentrations variant de 0,2 à 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler^R Personal (Eppendorf, AG Hamburg, Allemagne). Le Programme PCR utilisé pour l'amplification de l'ADNr 16S est le suivant :

- dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min ;
 - dénaturation à 94°C pendant 30 sec
 - hybridation à 50°C pendant 30 sec
 - élongation à 72°C pendant 1 minute
 - élongation finale à 72°C pendant 4 min.
- } 30 cycles ;

La deuxième PCR s'est faite sur les produits de la première, en amplifiant une région discriminante de l'ADNr16S, la région V3 sur une longueur d'environ 200pb avec les amorces HDA₁-GC et HDA₂ (MWG-Biotech AG). L'amorce HDA₁ contient en son extrémité 5' une queue GC (en anglais, GC clamp) de 40 nucléotides qui n'est pas destinée à s'hybrider avec l'ADN mais va être présente sur tous les fragments après amplification. Compte tenu de la composition de cette séquence GC, son T_m, très élevé, prévient toute possibilité de dénaturation complète du fragment amplifié.

Le volume réactionnel de 50 μL est composé de :

- 0,5 μL de produit de la première PCR ;
- 0,5 μL de HDA₁-GC ;
- 0,5 μL HDA₂ ;
- 2 μL de DMSO (Diméthyl sulfoxyde, Euromedex) ;

- 0,25 µL de Taq polymérase ;
- 46,75 µL de tampon MgCl₂ et dNTPs.

Les cycles d'amplification sont programmés comme suit:

- dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min ;
 - dénaturation à 94°C pendant 30 sec
 - hybridation à 58°C pendant 30 sec
 - élongation à 72°C pendant 1 min
 - élongation finale à 72°C pendant 5 min.
- } 30 cycles ;

Les séquences des amorces utilisées pour les PCR 16S et V3 sont dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Amorces utilisées pour la Nested-PCR

Couple d'amorces	Séquence (5'→3')	Position	Température de fixation
W01	AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC	F9	50°C
W012	TAC GCA TTT CAC C(GT)C TACA	R702	
HDA₁-GC	CGC CCG GGG GCA CGG GCG GGG GCA	F338	58°C
	CGG GGG GAC TCC T		
HDA₂	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	R536	

La position indiquée correspond à celle de la première base de l'amorce en partant de l'extrémité 5', définie sur l'ADNr 16S d'E.coli. F et R correspondent respectivement à Forward et Reverse.

2.3. Vérification des produits PCR par électrophorèse en gel d'agarose.

La vérification de la présence de l'ADN après les PCR 16S et V3 a été réalisée par électrophorèse sur un gel d'agarose (D-S DANN grade, Euromedex) à 1,5 %. L'agarose a été dissous à chaud dans un tampon TBE 1X (10X TBE Buffer ; 0,89M Tris-Borate, 0,02M EDTA, AccuGène, Verviers, Belgium). Le gel en surfusion a été refroidi à 50 °C, complété de BET (Bromure d'éthidium) (Biorad) solution 10 µg/µL, pour atteindre une concentration finale de 0,1 µg/mL. Après coulage et solidification du gel, celui-ci a été immergé dans une cuve à électrophorèse horizontale contenant du TBE 1X. Les puits de gel sont chargés avec 2 µL de chaque échantillon d'ADN à visualiser additionnés de 3 µL de bleu de charge (EDTA 100mM, bleu de bromophénol 1,5mg/mL et saccharose 40%). Un marqueur

de poids moléculaires connus, GenRuler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µL (Fermentas, France) est mis à migrer parallèlement pour servir d'échelle de taille moléculaire aux produits PCR. La migration dure environ 1h30 sous un ampérage constant de 150 mA et une tension de 80 V.

2.4. Séparation des produits PCR par la TTGE et la DGGE

La séparation des amplicons a été réalisée grâce au système « Dcode Universal Mutation Detection System » (Biorad). Ce système utilise une cuve d'électrophorèse dotée d'un module de chauffage et d'une pompe assurant la circulation du tampon de migration. L'électrophorèse a été réalisée sur des gels de 16 cm x 16 cm x 1 mm.

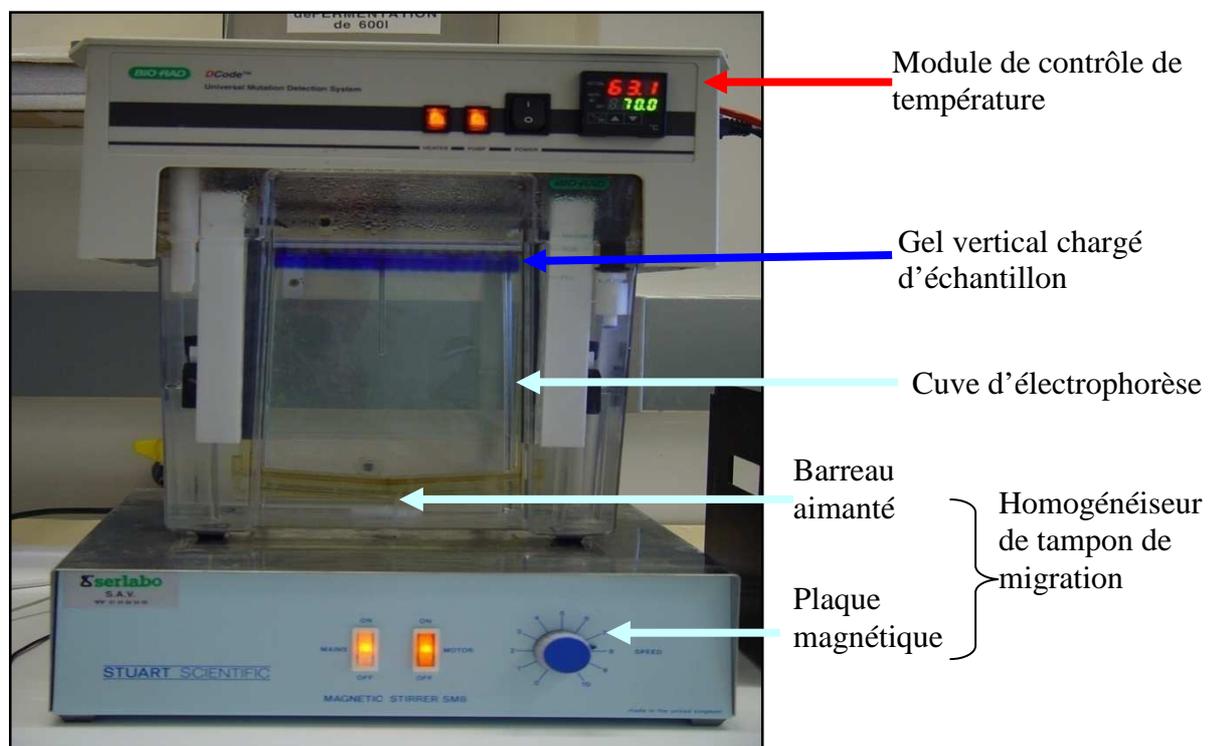


Figure 8 : Système « Dcode Universal Mutation Detection System » de Biorad utilisé pour la TTGE et la DGGE

2.4.1. Séparation des produits PCR par le gel TTGE

Le gel TTGE a été préparé et coulé selon les protocoles optimisés par **Ogier *et al* (2002)**. Le gel à 8% d'acrylamide dont la concentration en urée est de 6 mmol/L a été préparé en mélangeant 14,4 g d'urée (Euromedex) avec 18 mL d'eau milliQ stérile, 1 mL de tampon TAE 50X (Biorad) et 8 mL d'acrylamide (solution d'acrylamide et bisacrylamide à 40% (p/v) (Biorad). L'urée assure la dénaturation de l'ADN alors que l'acrylamide permet de créer le réseau des mailles dans le gel. Le mélange a été dissout à l'aide d'un agitateur magnétique. A parfaite dissolution, le volume a été ajusté à 40 mL avec de l'eau milliQ puis très rapidement 400 µL de persulfate d'ammonium à 10% (p/v) (Biorad) et 40 µL de Temed (v/v) (Biorad) ont été rajoutés. Ces derniers initient et catalysent la polymérisation de l'acrylamide. Le gel a été coulé entre deux plaques de verres espacées de 1 mm. Après coulage du gel, le peigne a été inséré pour former des puits destinés à accueillir les échantillons puis le gel a été laissé polymériser pendant environ 2 h.

Le gel polymérisé a été laissé migrer verticalement dans 7 litres de tampon TAE 1,25 X préchauffé à 68°C. Les puits du gel ont été chargés avec 10 µL de produit PCR auxquels ont été rajoutés 10 µL d'un tampon de charge constitué d'EDTA 100 mM, de bleu de bromophénol 1,5mg/mL et de saccharose 40%. Parallèlement, 5 µL d'un marqueur de standardisation contenant 4 souches de référence (*Lactococcus garvieae* CNRZ 1323, *Lactococcus raffinolactis* CNRZ 1214, *Enterococcus faecalis* CE 17 et *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biov. *diacetylactis* CNRZ 1260) additionnées de 10 µL de bleu de charge ont été déposés au début, au milieu et à la fin du gel pour servir de référence.

La programmation du module de contrôle (points de consigne des températures et d'incrémentations) a permis d'appliquer un gradient linéaire de température dans le temps. Le tampon a été agité à l'aide d'un barreau aimanté qui assurait l'homogénéisation de la température dans la cuve à tout instant. Après dépôt des échantillons, la température a été réglée à 63°C (incrémentations 200) et l'appareil a été mis en route pendant 1 min pour faire pénétrer l'ADN dans le gel. Dès que l'ADN a été bien pénétré (environ 3 minutes), le générateur de courant a été réglé avec les conditions de migration suivantes :

- ⚡ Temps de migration : 16 h ;
- ⚡ Gradient 0,4°C/h ;
- ⚡ Température initiale : 63°C ;

- ⚡ Température finale : 70°C ;
- ⚡ Voltage : 41 V ;
- ⚡ Ampérage : 31 mA.

2.4.2. Séparation des produits PCR par le gel DGGE

Le gel DGGE est composé de deux solutions de concentrations en urée-formamide différentes. La première solution, faible densité, a une concentration de 40 % et la seconde, haute densité, a une concentration de 70 %. Un dispositif particulier permet de couler le gel entre les plaques et d'obtenir un gradient de concentration de 40 % à 70 % en urée-formamide. Le gel DGGE a été préparé comme indiqué dans le tableau IX.

Tableau IX : Préparation des solutions de gel DGGE

Solution à 40% (faible densité)	Solution à 70% (haute densité)
<ul style="list-style-type: none"> • Dissolution de 4,2 g d'urée dans 9 mL d'eau milliQ stérile • Ajout de 500 µL de tampon TAE 50X, 5 mL d'acrylamide et 4 mL de formamide (Euromedex) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dissolution de 7,35 g d'urée dans 5 mL d'eau milliQ stérile • Ajout de 500 µL de tampon TAE 50X, 5 mL d'acrylamide et 7 mL de formamide
<ul style="list-style-type: none"> • Après dissolution, ajustement des volumes à 25 mL avec de l'eau milliQ stérile. • Ajout à chaque solution de 125 µL de persulfate d'ammonium 10% et 12,5 µL de Temed • Aspiration de 23 mL de chaque solution à l'aide de deux seringues qui sont placées par la suite sur le dispositif destiné à former le gradient 	

Les deux solutions ont été injectées entre deux plaques de verre espacées d'1 mm à l'aide d'un dispositif de coulage, *Gradient delivery System Model 475* (Biorad) qui par l'action d'une roulette, distribuait de manière différente les deux solutions. Dès que le gel a été coulé, les peignes ont été placés pour former les puits. Comme pour la TTGE, le gel polymérisé a été placé verticalement dans un tampon TAE 1,25 X préchauffé à 68°C. Pour chaque échantillon, 10 µL de produit PCR ont été mélangés avec 10 µL d'un tampon de charge puis déposés en haut du gel.

Trois marqueurs DGGE contenant 6 souches de référence (*Bacillus pumilus* ATCC 7725, *Klebsiella oxytoca* ATCC 103434T, *Kytococcus sedentarius* CNRZ 880T, *Arthrobacter citreus* CNRZ 928T, *Kocuria kristinae* CNRZ 872 et *Propionibacterium jensenii* Z87) ont été également déposés.

La température a été réglée à 60°C puis l'appareil mis en route pendant 1 min pour faire pénétrer l'ADN. Dès que l'ADN a été bien pénétré, le générateur a été branché avec les conditions de migration fixées comme suit:

- ✚ Température finale : 60°C ;
- ✚ Voltage constant : 92 V ;
- ✚ Ampérage : 65 mA ;
- ✚ Temps de migration: 16 h.

Les gels TTGE et DGGE ont été révélés sous une légère agitation pendant 15 min dans un bain de TAE 1X contenant 0,5 µg/mL de BET puis rincés 20 min dans un bain d'eau osmosée. Les gels colorés ont été visualisés sous une lampe UV puis photographiés avec le système polaroid LTD (Saint Albans, Angleterre). Les photographies de gel ont été converties en fichier image par l'intermédiaire d'une caméra reliée à un ordinateur muni d'un logiciel approprié, *Photo Capt Imager Software*.

2.5. Assignment des bandes électrophorétiques aux empreintes d'espèces de la base des données

Les photographies des gels TTGE et DGGE ont été analysées avec le logiciel GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) afin de rechercher la correspondance des profils à une base de données TTGE et DGGE. La base de données utilisée comprend deux référentiels distincts : le référentiel bas GC%, établi à partir des profils TTGE et qui regroupe les espèces bactériennes dont la composition en bases GC de la séquence V3 est inférieure à 55% et le référentiel haut GC%, établi à partir des profils DGGE et qui regroupe les espèces bactériennes dont la composition en bases GC de la séquence V3 est supérieure à 55% (**Ogier et al., 2002 ; Ogier et al., 2004**).

2.6. Identification des bandes à espèces non répertoriées dans la base des données TTGE et DGGE

Les fragments d'ADN correspondant aux espèces mal ou non assignées aux espèces répertoriées dans la base des données ont été découpés sur le gel puis séquencés. La région variable V3 des fragments d'ADN a été amplifiée grâce aux amorces HDA₁ (sans le GC-clamp) et HDA₂. Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit *PureLink™ PCR purification* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) selon les recommandations du fabricant. La qualité et l'intégrité de l'ADN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % alors que la pureté et la concentration de l'ADN élué ont été évaluées par spectrophotométrie (ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA)). L'ADN a été ensuite dilué pour obtenir une concentration de 10 à 30 ng/μL dans un volume de 30 μL avant d'être envoyé au séquençage. Le programme BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotids*) du site NCBI (Anonyme 5, 2009) a été utilisé pour l'identification des fragments obtenus.

2.7. Identification des espèces sous-dominantes par les PCR spécifiques

Les techniques TTGE et DGGE ne permettent de détecter que les flores majoritaires, c'est-à-dire représentant plus de 1% de la flore totale (Ogier *et al.*, 2002). Les PCR spécifiques des espèces potentiellement pathogènes comme *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* ont été réalisées. Seuls les échantillons (lait cru de vache ou de chèvre, lait fermenté de vache et fromage de chèvre) dans lesquels ces germes avaient été mis en évidence par les méthodes de microbiologie classique ont fait l'objet de tests de PCR spécifiques.

Pour chaque échantillon, l'amplification de l'ADN total contenu dans un patch FTA de 0,2 mm a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 μL composé de :

- 0,5 μL de l'amorce sens à 60 μM ;
- 0,5 μL de l'amorce anti-sens à 60 μM ;
- 1μL de BSA à 30 μg/μL ;
- 0,5 μL de Taq polymérase à 5 U/μL ;
- 47,75 μL d'une mixture composée de 1,5 μM de MgCl₂, de 200 μM de chaque dNTP.

La dénaturation initiale a été faite à 94°C/4 minutes. La dénaturation initiale a été suivie de 30 à 40 cycles comprenant une dénaturation des brins à 94°C pendant 30 secondes, suivie d'une phase de fixation de l'amorce pendant 30 secondes puis une phase d'élongation à 72°C pendant une minute. La PCR a été terminée par une élongation finale de 5 minutes à 72°C.

Après l'amplification, les produits PCR ont été séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 2 %. L'agarose a été dissout à chaud dans du tampon TBE 0,5 X. Le gel en surfusion a été refroidi à 50 °C avant d'ajouter 0,5 µg/mL de BET. Les produits PCR ont été mélangés avec du tampon de charge puis déposés sur le gel, ainsi qu'un marqueur de taille (GenRuler™ DNA Ladder Mix 0,5 µg/µL) permettant d'estimer la taille du fragment amplifié. Le gel chargé a été laissé migrer horizontalement dans un tampon TBE 1X sous un ampérage constant de 80 mA jusqu'à ce que le bleu de charge atteigne une hauteur de 5 cm (migration pendant au moins 1h30). A la fin de la migration, les gels ont été visualisés sous une lampe UV puis photographiés. Ils ont ensuite été convertis en fichier image par l'intermédiaire d'une caméra reliée à un ordinateur muni d'un logiciel approprié, *Photo Capt Imager software*. Les amorces utilisées pour les PCR spécifiques sont répertoriées dans le tableau X.

Tableau X : Amorces utilisées pour les PCR spécifiques d'espèces

Espèce	Amorce sens (5'→3')	Amorce anti-sens	Référence
<i>Escherichia coli</i>	Eco 223: ATC AAC CGA GAT TCC CCC AGT	Eco 455: TCA CTA TCG GTC AGT CAG TCA GAG	Riffon <i>et al.</i> , 2001
<i>Staphylococcus aureus</i>	STAA-AuI : TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA	STAA-AuII : TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG	Forsman <i>et al.</i> , 1997
<i>Staphylococcus sp.</i>	St I : GGA ATA ACG TGA CAT ATT GTA	St II: TTC ACT CGT TTT TGC TTG G	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sens = LIM 2 : CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT	LIMRE : CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT	Hein <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Sther03 : TTA TTT GAA AGG GGC AAT TGC T	Sther08 : GTG AAC TTT CCA CTC TCA CAC	Furet <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptococcus sp.</i>	Str I : TGT TTA GTT TTG AGA GGT CTT G	Str II: CGT GGA ATT TGA TAT AGA TAT TC	Forsman <i>et al.</i> , 1997

IV. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECHANTILLONS

La caractérisation physico-chimique des échantillons a concerné le dosage des protéines totales et la matière grasse dans toutes les matrices analysées (laits crus, lait fermentés et fromages), la détermination de la teneur en eau et en chlorure de sodium dans les fromages et enfin la mesure de l'acidité titrable dans les échantillons de laits fermentés.

1. Matériel

Le matériel biologique est constitué d'échantillons de lait cru de vache, de lait cru de chèvre, de laits fermentés de vache et de fromages de chèvre prélevés dans douze exploitations bovines et deux fromageries.

1.1. Echantillons de lait cru et fermenté de vache

Les analyses physico-chimiques ont porté sur les 36 échantillons prélevés dans les douze exploitations suivies. A la différence de la microbiologie classique où chaque échantillon a été analysé individuellement, pour le dosage des protéines totales et de la matière grasse, une « unité d'analyse » a été formée, à partir de trois échantillons prélevés dans la même exploitation.

1.2. Echantillons de lait cru et fromages de chèvre

Compte tenu de leur nombre relativement faible tous les échantillons de lait cru et fromages de chèvre ont été analysés individuellement, soit 8 échantillons de lait crus de chèvre et 8 fromages de chèvre affinés.

2. Méthodes

2.1. Détermination de l'acidité titrable

L'acidité titrable ou acidité Dornic a été mesurée en suivant la méthode de référence (AOAC, 1996). Le principe de la méthode consiste à faire une titration classique du lait à l'aide de la soude caustique 1N en présence d'un indicateur coloré.

Une prise d'essai de 10 mL de lait a été mélangée dans un bécher avec 10 mL d'eau du robinet. A ce mélange, il a été ajouté 3 gouttes de phénolphthaléine à 1 %. Le bécher a été ensuite remué pour homogénéiser le mélange. Une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N contenue dans une burette a été ajoutée au mélange goutte à goutte jusqu'à ce que le contenu du bécher vire au rose. L'acidité titrable a été exprimée en degrés Dornic (°D) qui est le volume en dixième de millilitre (1/10 mL) de NaOH (0,1 N) utilisée pour titrer 10 mL de lait. Ainsi 1°D = 1 mg d'acide lactique dans 10 mL de lait, soit 0,1 g/L ou 0,01 % d'équivalent d'acide lactique.

2.2. Dosage de la teneur en protéines totales

La teneur en azote total a été dosée par la méthode de référence de Kjeldahl (FIL, 1993). A une prise d'essai de 10 g contenue dans un tube de Büchi, il a été ajouté 10 mL d'acide sulfurique concentré (96%) et un catalyseur constitué de 1 g de sulfate de cuivre, de 100 mg de sulfate de potassium et de 1 g de sélénium. Les tubes ont été placés sous un bloc de minéralisation lequel a été mis en marche sous une hotte. La minéralisation s'est poursuivie jusqu'à la disparition totale des vapeurs blanches (environ 1 heure). Après refroidissement, le minéralisât a été distillé à l'aide de l'acide borique à 4%. L'excès d'acide a été dosé par la soude 0,5 N. Un essai à blanc a été réalisé en remplaçant la prise d'essai par une quantité équivalente d'eau distillée pure. Le résultat est exprimé en % d'azote. La formule 1 a été utilisée pour calculer le résultat.

Formule 1 : Calcul de la teneur en azote total dans les échantillons de lait ou de fromage

$$\text{Azote (\%)} = \frac{(14 \times (V_1 - V_0) \times \text{Norm.}) \times 100}{P}$$

V_1 = volume d'acide nécessaire pour titrer l'échantillon (mL)
 V_0 = volume d'acide nécessaire pour titrer le blanc
 P = prise d'essai
 14 = masse moléculaire de l'azote

La teneur en protéines totales est calculée en multipliant le pourcentage d'azote par un facteur de conversion qui est de 6,38 pour le lait et les produits laitiers.

2.3. Dosage de la teneur en matière grasse

Pour le dosage de la matière grasse, nous avons utilisé la méthode Rose Gottlieb. Dans une ampoule à décanter, il a été introduit 10 mL de lait ou 10g de fromage préalablement broyés. A chacune prise d'essai, il a été ajouté 1 mL d'ammoniaque pure, 10 mL d'éthanol à 95%, 25 mL d'éther éthylique puis 25 cm³ d'éther de pétrole. Le mélange a été agité fortement par retournement puis l'ampoule a été laissée au repos jusqu'à la séparation nette des deux phases. La phase inférieure a été récupérée par le bas dans un bécher et la phase supérieure par le goulot de l'ampoule. Cette dernière a été filtrée sur 1 g d'hydrogénosulfate de sodium et le filtrat a été recueilli dans un bécher préalablement taré et qui a été laissé sous la hotte pour l'évaporation. Après l'évaporation, le bécher a été laissé à l'étuve à 100°C pour éliminer les dernières traces de liquide puis pesé. La masse de la matière grasse dans l'échantillon s'exprime en pourcentage et est calculée selon la formule 2 ci-après :

Formule 2 : Calcul de la teneur en matière grasse dans les échantillons de lait ou de fromage

$MG (\%) = 100 (M2 - M1) / P$ $M1$ = la masse du bécher vide, $M2$ = la masse du bécher après l'extraction et P = prise d'essai sa masse

2.4. Dosage de la teneur en eau

La teneur en eau a été effectuée selon la méthode de l'étuve ventilée. Le principe de cette méthode a consisté à peser 10 g de fromage dans une capsule en aluminium. La capsule a été placée dans une étuve ventilée à une température de 100°C pendant 3 h. La teneur en eau exprimé en pourcentage par unité de masse calculée par la différence entre la pesée avant et après la dessiccation.

2.5. Dosage de la teneur en chlorure de sodium

Le dosage de la teneur en NaCl a été fait sur les fromages par conductimétrie avec un chloruremètre à lecture digitale, *Corning 926* (Halstead, Essex, Angleterre). Le principe consiste à oxyder les protéines contenues dans l'échantillon en utilisant une solution de nitrate d'argent dans de l'acide nitrique concentré. La matière organique est alors détruite et le chlore précipite en même temps.

L'excès de nitrate d'argent est alors titré avec une solution de thiocyanate. Pour doser la teneur en NaCl, à 5 g de fromage ont été ajoutés 20 mL d'eau citratée à 2%. Le mélange a été broyé à l'ultra-turax pendant 1 minute, transvasé dans une fiole jaugée de 100mL et le volume a été ajusté avec de l'eau milliQ. Après homogénéisation, 0,5 mL de solution a été prélevé dans la fiole puis mis dans un bécher contenant 15 mL de tampon combiné acide. Trois mesures sont réalisées pour chaque échantillon et la moyenne des trois est retenue. L'appareil affiche le résultat en mg de pourcentage de sel. Pour avoir le résultat en gramme de fromage, il faut multiplier par 2 puis diviser par 100.

VI ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Le traitement statistique a concerné surtout les données quantitatives issues des analyses physico-chimiques et de microbiologie classique. Dans chaque exploitation, les prélèvements avaient été répétés trois fois, pour qu'à chaque paramètre soit associé une valeur moyenne et un écart-type exploités pour réaliser des tests statistiques. Les données ont été saisies sous Excel puis analysées par le logiciel *SPSS 16.0 sous windows*. Les moyennes et écarts types ont été calculés au niveau de probabilité $P \leq 0.05$. Une analyse de la variance avec un intervalle de confiance de 95 % a été effectuée pour comparer les populations bactériennes des laits crus des différents systèmes d'élevage.

Chapitre 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. CONDITIONS DE PRODUCTION DES LAITS ET PRODUITS LAITIERS FERMENTES ARTISANAUX PRODUITS AU SENEGAL

L'étude des conditions de production des laits crus et fermentés de vache, des laits crus et des fromages de chèvre produits artisanalement au Sénégal a été centrée sur la caractérisation morphologique des races exploitées, les pratiques adoptées par les éleveurs pour la conduite du troupeau, l'appréciation de l'hygiène dans les étables et au cours de la traite. Les procédés de transformation du lait ont été également renseignés. Ces travaux ont été menés chez les producteurs, dans les élevages et ateliers fermiers, et ce, sur la base d'enquêtes ponctuelles conduites pendant 3 mois (de janvier à mars 2008).

1. Résultats

1.1. Caractéristiques des exploitations bovines suivies

Les caractéristiques des 12 exploitations bovines suivies et réparties dans les trois systèmes d'élevage habituellement décrits au Sénégal, sont résumées dans le tableau XI.

Tableau XI : Caractéristiques des exploitations laitières suivies

Paramètres observés	Exploitations de type intensif (n=4)	Exploitations de type semi-intensif (n=4)	Exploitations de type extensif (n=4)
Localisation	Zone des Niayes (régions administratives de Dakar et de Thiès)	Bassin arachidier (région de Kaolack)	Zone sylvo-pastorale (région de Saint-Louis et de Louga).
Races exploitées	Races importées (France) : Holstein, Normande et Jersiaise (3 exploitations/4) Races importées (France et Brésil) : Girolando et Nerolé (1/4)	Races locales zébus (<i>Bos indicus</i>), taurins (<i>Bos taurus</i>) et leur produit de croisement (2/4). Produits de croisement entre les races importées et les races locales (2/4)	Races locales, zébus et taurins et leur produit de croisement
Conduite du troupeau	Stabulation permanente, rations adaptées au stade physiologique des animaux : paille de brousse et de riz, fane d'arachide, maïs concassé, aliments usinés « <i>spécial vache laitière</i> » Suivi sanitaire assuré par un docteur vétérinaire (3/4), agent technique d'élevage (1/4) salariés à temps plein	Conduite sur pâturage avec complémentation des vaches en lactation par les sous-produits agricoles (fane et tourteau d'arachide), provende commerciale non spécifiée « <i>Jarga</i> », absence de suivi sanitaire (2/4) Stabulation permanente, alimentation équilibrée mais insuffisante, suivi sanitaire ponctuel (2/4)	Utilisation exclusive des parcours naturels, transhumance une partie de l'année Pas de suivi sanitaire, cas d'automédication
Modalités de la traite	Traite mécanique biquotidienne en absence du veau (3/4) ; traite manuelle biquotidienne parfois en présence du veau (1/4)	Traite manuelle, biquotidienne systématiquement en présence du veau	Traite manuelle biquotidienne toujours en présence du veau
Hygiène dans les étables et lors de la traite	Satisfaisante : bâtiments en dur, toiture en tôle, revêtement en terre bétonnée, salle de traite, réfrigération précoce du lait dans des tanks de refroidissement couplés au système de traite (3/4) Acceptable : bâtiments en dur, traite manuelle, salle de traite séparée des salles de repos, lavage des mains du trayeur, lavage des trayons, matériel de traite en inox ou en matière plastique, filtration et refroidissement du lait (1/4)	Médiocre : traite à l'air libre, pas de lavage ni des mains du trayeur ni de la mamelle ; vaisselle laitière en matière plastique ou en végétal, pas de réfrigération du lait (2/4). Passable : traite dans la bouverie, lavage sommaire à l'eau des mains du trayeur, pas de lavage des trayons ; vaisselle laitière en aluminium ou en matière plastique, réfrigération du lait au plus tard une heure après la traite dans des réfrigérateurs domestiques en présence d'autres denrées (2/4).	Médiocre : traite manuelle en plein air, pas de lavage ni des mains du trayeur ni de la mamelle ; vaisselle laitière essentiellement en bois
Production du lait/vache/jour	16 litres en moyenne (3/4), 12 litres en moyenne (1/4)	1 à 2 litres (2/4), 4 à 5 litres (2/4)	1 litre parfois moins par vache et par jour

La traite mécanique était pratiquée dans trois exploitations sur les douze suivies, les neuf autres exploitations pratiquant une traite manuelle. Lorsque la traite était mécanique, elle se faisait dans des conditions d'hygiène satisfaisantes alors que lorsqu'elle était manuelle, l'hygiène n'était toujours pas garantie. Les figures 9 et 10 illustrent respectivement les pratiques d'une traite mécanique et manuelle.



Figure 9 : Illustration d'une traite mécanique (élevage intensif)



Figure 10 : Illustration d'une traite manuelle (élevage semi-intensif)

Photographies prises par Musabyemariya B.

Concernant le volume du lait produit, de façon générale, dans les élevages extensifs, la production du lait subit des fluctuations saisonnières. En saison sèche (janvier à mai) la traite est suspendue pour la majorité des vaches en lactation du fait de la raréfaction des pâturages. A l'opposé, la saison de pluie est une période favorable à la production laitière car les pâturages sont bien garnis et l'eau est en quantité suffisante. Cependant, pendant cette période, l'inaccessibilité des zones ne permet pas d'acheminer le lait vers les centres de consommation. Quant aux exploitations semi-intensives et intensives, elles fournissent du lait toute l'année, même si les quantités sont faibles pendant la saison sèche du fait de la diminution de la valeur alimentaire du fourrage fauché et son coût d'acquisition relativement élevé lorsqu'il est échangé sur le marché.

1.2. Caractéristiques des exploitations caprines suivies

Les exploitations caprines suivies fournissaient du lait à deux fromageries notées A et B. Pour la fromagerie A, la matière première était du lait de collecte provenant de 15 élevages mixtes regroupant à la fois les bovins, les ovins et les caprins avec cependant une collecte différenciée des laits des différentes espèces. Le nombre de chèvres par exploitation variait de 15 à 30. Ces chèvres étaient toutes de race locale appelée communément « *chèvre du Sahel* », élevées sous un mode extensif et nourries exclusivement avec de l'herbe pâturée sur les parcours naturels. Aucun suivi sanitaire n'était assuré mais l'état de santé des chèvres laitières semblait satisfaisant. La production laitière était faible, à peine 0,5 litre/jour/chèvre. La quantité de lait collectée par la fromagerie était en moyenne de 180 litres par jour. La traite était biquotidienne (matin et soir) et se faisait manuellement sans aucune précaution d'hygiène. Seuls les laits de mélange de la traite du matin étaient collectés pour la fromagerie, le lait traité le soir étant réservé à l'autoconsommation.

La fromagerie B fait partie d'un système agropastoral multidimensionnel avec une chèvrerie, une étable laitière et des infrastructures d'apprentissage. Le système intégrait la dimension appui conseil à travers le placement de boucs améliorateurs au sein des chèvriers des villages environnants. Cependant, les laits de fabrication provenaient de sa chèvrerie constituée de 25 chèvres en lactation dont 8 de race locale, 4 de race « *Saanen* », 5 de race « *Alpine* » et 8 chèvres métis issues du croisement entre les races importées (*Saanen et Alpine*) avec la race locale. La conduite du troupeau était mixte. Pendant la saison sèche, les chèvres étaient gardées en stabulation et nourries avec du foin. Pendant l'hivernage, elles allaient aux pâturages. Les chèvres étaient logées dans des étables propres avec une litière renouvelée régulièrement. Le suivi sanitaire était assuré par un vétérinaire installé en clientèle privée, à 30 km de l'unité. La production laitière était en moyenne 2 L/jour pour les races exotiques, 1L/jour pour les métis et 0,5 L/jour pour les chèvres de race locale. La traite était manuelle et se faisait après un lavage à l'eau des trayons et des mains du trayeur.

1.3. Typologies de la fermentation du lait

1.3.1. Transformation du lait cru de vache en lait fermenté

En dehors du matériel utilisé pour la fermentation et les aspects organisationnels, la fermentation du lait ne différait pas techniquement d'un système à l'autre.

Dans le système extensif, la transformation du lait est une activité purement domestique et individuelle. Elle était assurée par des femmes d'âge adulte (30 ans et plus), de culture pastorale (ethnie peul) et donc ayant un savoir-faire ancestral en la matière. Après la traite qui était également assurée par les femmes, le lait de mélange était remis à l'épouse de la concession ayant en charge la préparation du repas familial pour la journée. En effet, dans les villages où cette étude a été conduite, le mode de vie était communautaire. Les membres d'une fratrie prenaient leur repas ensemble et géraient collectivement le troupeau considéré comme un patrimoine familial.

Le lait de collecte était divisé en 3 parts :

- ✚ une partie destinée à la consommation familiale : ce lait frais accompagnait le repas du soir, qui est le plus souvent à base de céréales locales ;
- ✚ une part qui devrait être transformée en lait fermenté puis vendue pour l'achat des condiments ;
- ✚ une dernière partie revenant à la femme pour son usage personnel (accueil d'amis, vente pour achat d'effets de toilette ou d'autres objets à usage personnel).

Dans les exploitations de type semi-intensif, il a été observé deux formes d'organisation. Dans la première forme d'organisation le lait de collecte était livré à une mini-laiterie communautaire acquise sous la houlette du Directoire des Femmes en Elevage (DIRFEL), une association d'envergure nationale au Sénégal. Au niveau de la mini-laiterie, la fermentation était assurée par des femmes (ethnie peul), membres du DIRFEL. Dans le deuxième cas de figure, la transformation se faisait sous forme de petites entreprises individuelles. La traite était tout d'abord assurée par un bouvier salarié qui livrait ensuite le lait au propriétaire des animaux habitant généralement à proximité de l'étable.

C'était l'épouse de ce dernier qui s'occupait de la fermentation et de la vente du lait. Enfin, dans le système intensif, le lait était refroidi avant d'être fermenté. Trois exploitations sur les quatre étaient équipées de tanks de refroidissement et la quatrième utilisait des réfrigérateurs domestiques. La fermentation se faisait à la ferme et était confiée à une main d'oeuvre masculine salariée.

En ce qui concerne le matériel utilisé pour la fermentation, dans le système extensif, chaque femme possédait sa collection dealebasses pour la traite et la collecte du lait, pour la fermentation et pour servir le lait. Ce matériel est communément appelé « vaisselle laitière ». Lesalebasses utilisées sont en bois (**figure 11**) ou encore en fruit de *Cucurbitaceae* vidé et séché (**figure 12**). On retrouve également dans la vaisselle laitière des fouets et cuillères en fruits (**figure 13**) et des outres en peau de mouton (**figure 14**).



Figure 11 : Calebasse en bois utilisée pour la fermentation du lait (système extensif)



Figure 12 : Calebasse en « fruit » pour fermentation du lait (Système extensif)



Figure 13 : Cuillère en « végétal » utilisée pour la mesure du lait (système semi-intensif)



Figure 14 : Outre en peau de mouton pour fermentation et barattage du lait fermenté (système extensif)

Photographies prises par Musabyemariya B.

Le matériel utilisé pour traire et fermenter le lait avait généralement une place qui lui était réservée dans la case, à l'avant du lit. Cesalebasses symbolisent tout le savoir-faire féminin en matière de transformation du lait car elles se transmettent de mère en fille. Certains ustensiles qui nous ont été présenté avaient plus de 10 ans d'âge. La décoration et la beauté de cette vaisselle laitière fait la fierté des femmes de l'ethnie peul (**figures 15 et 16**).



Figure 15 : Calebasse en bois pour la vente du lait (système semi-intensif)

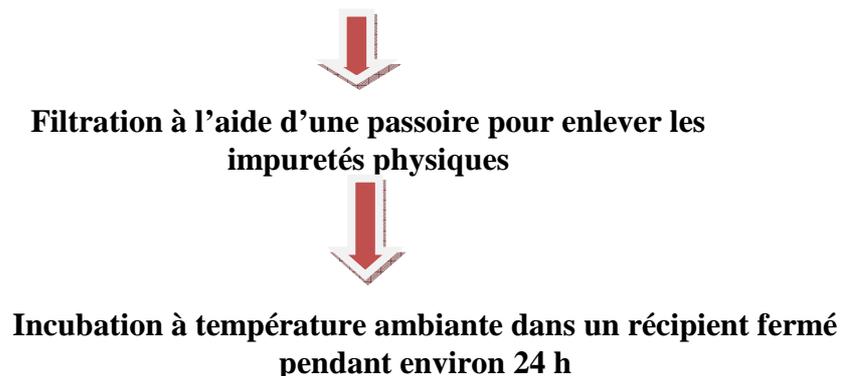


Figure 16 : Calebasse en bois pour la fermentation du lait (système extensif)

Photographies prises par Musabyemariya B.

Pour les exploitations appartenant aux systèmes semi-intensif et intensif, le matériel utilisé était essentiellement en matière plastique, en aluminium et parfois en inox.

Pour ce qui est des procédés de fermentation du lait, les schémas de fabrication dans les douze exploitations suivies étaient les mêmes. Il n'y avait pas d'espace réservé à proprement parler pour cette activité. La fermentation se faisait dans les concessions ou à la ferme. Après la traite le lait était filtré (à travers des tamis) ou non, puis mis dans des calebasses en bois (système extensif) ou dans des bassines en matière plastique ou en aluminium (systèmes semi-intensif et intensif). Les récipients étaient fermés (avec un van « layou » tressé pour les calebasses) puis mis dans un coin. Aucun ferment ni caillé de la veille n'était ajouté au lait. Le caillage durait environ 24 heures. C'était l'appréciation visuelle du gel qui déterminait la fin du processus de fermentation. Les opérations unitaires du diagramme de fabrication du lait fermenté dans les exploitations fermières suivies sont résumées dans la figure 17.

Traite et collecte du lait**Figure 17 : Diagramme de fabrication des laits fermentés traditionnels**

Après le caillage, le lait fermenté était stocké en vrac à température ambiante pour les exploitations de type extensif. Pour les autres exploitations, après un ensachage manuel, il était refroidi dans des réfrigérateurs à usage domestique. Le lait fermenté était vendu sur place ou dans des coins aménagés à cet effet. Les exploitations de type intensif, en périphérie de la ville de Dakar, disposaient de véhicules réfrigérants et livraient du lait fermenté à des particuliers, sur les lieux de travail.

En ce qui concerne l'hygiène, tout comme lors de la traite, à l'exception des élevages de type intensif, l'hygiène faisait défaut au cours du processus de la transformation du lait. La vaisselle laitière était lavée à l'eau uniquement, le personnel affecté à la transformation n'avait pas de tenue de travail et l'état de propreté du lieu où se faisait la production ne garantissait pas non plus un lait fermenté exempt de contamination secondaire.

1.3.2. Transformation du lait de chèvre en fromage

Comme pour les laits fermentés, les schémas de fabrication dans les deux fromageries étaient de type fermier et n'étaient pas standardisés. Les technologies fromagères faisaient appel à un caillage mixte (présure + levains lactiques). La fromagerie A produisait un fromage à pâte molle et à croûte fleurie. Après la thermisation (65°C/ 1 minute), le lait était refroidi dans des bacs à refroidissement pendant une dizaine de minutes.

L'ensemencement se faisait à 23°C avec un levain constitué d'*Ezal MA 016-10 unités*. A ce levain lactique, était ajoutée une enzyme protéolytique, substitut de la présure, la «*Fromase TL*».

Le fleurage des fromages se faisait à l'aide d'un mélange composé de *Penicillium candidum SAM*, *Penicillium Geo 17* et *le VS*. Le fromage affiné, dont le poids variait entre 100 et 120 g était vendu aux grossistes au prix de 10.000 FCFA le kilogramme. La fromagerie B produit un fromage qu'on pourrait qualifier de «fromage frais » car la maturation n'était que de 4 jours. La fermentation était totalement tributaire de la microflore endogène. Les différentes étapes des schémas de fabrication dans les deux ateliers suivis sont mentionnées dans le tableau XII.

Tableau XII : Procédés de fabrication des fromages dans les deux fromageries suivies

Etapes	Fromagerie A	Fromagerie B
Préparation du lait	<ul style="list-style-type: none"> Lait entier thermisé de chèvre (traite du matin uniquement) Elimination des impuretés physiques par filtration Thermisation au bain marie : 65°C/1 minutes 	<ul style="list-style-type: none"> Lait entier cru de mélange de la traite de la veille au soir et du matin Elimination des impuretés physiques par filtration
Ensemencement et maturation du lait	<ul style="list-style-type: none"> Levain mésophile « <i>Ezal MA 016-10 unités</i> » dilué dans 1 litre de lait stérilisé pour 400 L de lait Quelques g de chlorure de calcium <i>Penicillium candidum SAM, Penicillium Geo 17 et le VS</i>, une dose de chaque élément à diluer dans 1 L d'eau pour ensemercer 1000 L de lait Température du lait : 23-25°C 	Bactéries lactiques présentes dans les laits de fabrication
Emprésurage, coagulation	<ul style="list-style-type: none"> 50 g de « <i>Fromase TL</i> », enzyme coagulante d'origine microbienne, délayée dans 0,75 mL d'eau stérile Temps de coagulation : 45-90 minutes Acidité du caillé : 25°D 	<ul style="list-style-type: none"> 7,5-10 mL de présure pour 100 L de lait Coagulation à environ 30-35°C pendant environ 12 h
Décaillage	<ul style="list-style-type: none"> Si caillé bien ferme : 2 tranchages à la harpe espacés de 8 heures Acidité : 35-40°D 	<ul style="list-style-type: none"> Découpage en petits cubes
Brassage	<ul style="list-style-type: none"> Brassage très délicat à la harpe 	<ul style="list-style-type: none"> Pas de brassage
Soutirage	<ul style="list-style-type: none"> Acidité : entre 40 et 50°D Mise en moule en transvasant le caillé 	<ul style="list-style-type: none"> Mise en moule à la louche
Autres opérations d'égouttage (retournement)	<ul style="list-style-type: none"> 1^{er} retournement 5 h après le moulage 2^{ème} retournement 8 h après le moulage 3^{ème} retournement 10 h après le moulage 	<ul style="list-style-type: none"> 3 retournements espacés d'une heure
Salage	<ul style="list-style-type: none"> Immersion en saumure pendant 2 heures Ressuyage 3 à 4 heures sans ventilation puis 4 à 6 heures avec ventilation. 	<ul style="list-style-type: none"> Immersion en saumure pendant 30 minutes
Affinage conditionnement	<ul style="list-style-type: none"> Affinage pendant 12 jours dans un hâloir à 10 -12°C, 90 % d'humidité Mouillage 3 fois par jour pour permettre l'implantation de <i>Penicillium</i>. Emballage dès le fleurage qui a lieu 8-9 jours après la mise en hâloir 	<ul style="list-style-type: none"> Affinage de 4 jours à température ambiante (30-35°C) Emballage

Les photographies ci-après illustrent certaines étapes de la production du fromage pratiquées dans la fromagerie A.



Figure 18 : Filtration du lait à la réception (fromagerie A)



Figure 19 : Tranchage du caillé (Fromagerie A)



Figure 20 : Moulage et égouttage des fromages (fromagerie A)



Figure 21 : Moulage et égouttage des fromages (fromagerie A)



Figure 22 : Fromage en cours d'affinage (fromagerie A)



Figure 23 : Fromage en fin d'affinage (fromagerie A)

Photographies prises par Musabyemariya B.

2. Discussion

2.1. Conditions de production des laits crus et fermentés de vache

Les exploitations bovines suivies appartiennent aux trois systèmes d'élevage décrits au Sénégal. Cette typologie a été fondée sur les modes de conduite des troupeaux basés sur la disponibilité des ressources végétales (**Lhoste *et al.*, 1993**). Dans cette étude, nous avons classé les douze exploitations bovines suivies en prenant en compte d'autres éléments comme les races exploitées, la conduite du troupeau, les pratiques de la traite et de la transformation du lait. D'après cette nouvelle typologie, il nous est apparu deux sous-catégories dans les exploitations de types intensif et semi-intensif.

Pour les exploitations de type intensif, la première catégorie comprenait trois exploitations avec des animaux importés (France), une alimentation adaptée, un bon suivi sanitaire et une traite mécanique propre. Ces conditions se traduisaient par une bonne intensification, en moyenne 15 L de lait /vache/jour. La deuxième catégorie comprenait une exploitation avec des races importées (France et Brésil), une alimentation adaptée, un suivi sanitaire correct, une traite manuelle propre et une intensification moyenne (10 L/vache/jour en moyenne).

Parmi les deux catégories de pratiques émergeant des exploitations de type semi-intensif, la première comprenait deux exploitations dont les vaches étaient issues d'un croisement entre les races importées et locales. Le troupeau, bien que relativement faible (7 têtes en moyenne), était constitué majoritairement de vaches en production et en stabulation permanente. L'alimentation était équilibrée (foin et aliment concentré) mais insuffisante en quantité. Le suivi sanitaire et zootechnique était absent. Ces conditions se traduisaient par un niveau d'intensification faible (4 L/vache/jour). La traite était manuelle et l'hygiène satisfaisante. Le deuxième groupe était composé également deux exploitations avec des animaux de race locale, une conduite mixte avec l'utilisation des parcours naturels et une complémentation des vaches en lactation. On notait en plus une absence d'intensification (2 L/vache/jour en moyenne) et une traite manuelle non hygiénique.

De façon générale, dans les exploitations de types intensif et semi-intensif, en plus des aliments fermiers (fane d'arachide, paille de riz, herbe fauchée) donnés aux animaux, l'utilisation de l'aliment concentré améliore les performances des vaches. Cette observation a déjà été faite par d'autres auteurs pour d'autres types d'élevage où le troupeau laitier était conduit sur pâturage naturel (**Hauwuy et al., 1993**).

Les 4 exploitations du système extensif avaient toutes des pratiques homogènes qui s'illustraient par l'exploitation des animaux de race locale, nourris exclusivement aux pâturages. L'appauvrissement de ces derniers en saison sèche et le faible potentiel laitier des animaux exploités étaient à l'origine de la faible production laitière (à peine 1 L/vache/jour). Les vaches étaient traitées manuellement et ce, dans des conditions d'hygiène médiocres. La conduite du troupeau était marquée par les longues distances à parcourir à la recherche de fourrage et d'eau. Même si les races locales ont de bonnes aptitudes à la marche suite à la sélection naturelle, un effort prolongé pourrait avoir pour conséquence la réduction de la production laitière comme cela a été observé dans les troupeaux français conduits au pâturage (**D'Hour et al., 1994**). Par ailleurs, l'automédication pratiquée dans ce type d'élevage pourrait causer de réels accidents technologiques ou même être un danger en santé publique. En effet, les résidus d'antibiotiques dans le lait peuvent inhiber la microflore lactique impliquée dans les fermentations. De même, ils peuvent être à l'origine d'une émergence des souches résistantes aux antibiotiques.

En ce qui concerne les pratiques de traite et l'environnement dans lequel se faisait cette traite, il a été noté que lorsque la traite était manuelle, elle se faisait en plein air. Ce qui exposait le lait à des contaminations diverses. De plus, aucune précaution particulière n'était prise pour assurer l'hygiène de la mamelle lorsqu'elle était sale et du matériel de traite. Lorsque la traite était mécanique, elle s'effectuait dans une salle conçue et aménagée à cet effet et l'hygiène était mieux maîtrisée, avec un souvent un système de nettoyage en place (NEP) pour la machine à traire. Cependant, dans ce cas de figure, il est essentiel que ce système garantisse que le lait ne contienne ni eau de rinçage ni résidus de produits de nettoyage ou de désinfection. Toujours dans les exploitations de type intensif, le refroidissement du lait après la traite était lent. C'est seulement 8 h après la traite que les tanks de refroidissement affichaient une température moyenne de 10°C.

De plus, le stockage pouvait durer jusqu'à 4 jours. Ce stockage prolongé du lait cru pourrait favoriser la prolifération microbienne, notamment celle des psychrophiles ou même altérer la qualité de certains composants du lait comme la matière grasse.

Dans le milieu pastoral, le travail du lait se faisait dans desalebasses taillées dans du bois ou en fruits de cucurbitacées vidés et séchés. Ce matériel n'était pas facile à nettoyer en raison de sa porosité. Les surfaces en contact avec le lait avaient des microcavités qui constituent autant de niches pour les bactéries. Lorsque le même matériel était utilisé sur plusieurs cycles de productions successifs, la contamination en était multipliée. Sur le plan technologique, l'utilisation d'une vaisselle en bois peut également participer à l'ensemencement naturel des laits par constitution des biofilms sur le matériel (**Licitra et al., 2007**).

Pour l'ensemble des trois systèmes, les exploitations laitières n'étaient pas connectées au secteur industriel dont la matière première était constituée par la poudre de lait importée. Des tentatives d'intégration de la production locale ont été menées par l'entreprise Nestlé mais les quantités concernées sont restées très faibles (**Broutin et al., 2000**). Dans ce contexte, l'application de bonnes pratiques d'hygiène tout au long de la filière devrait être une priorité pour limiter les pertes, améliorer la durée de conservation et les possibilités de distribution des produits tout en préservant la santé des consommateurs.

Concernant la technique de fermentation, les femmes transformatrices avaient un savoir faire empirique et une expérience suffisante qui leur permettaient de maîtriser le procédé. Cependant, elles manquaient de notions de base en hygiène des aliments. Ce qui ne leur permettait pas d'user de certains leviers pour maîtriser la qualité de leur produit. En élevage intensif et semi-intensif, le personnel était plus sensible aux questions de salubrité et sécurité du lait, l'encadrement par les techniciens étant régulier et rapproché. L'absence de maîtrise de la température d'incubation des laits fermentés reste un point critique dans le process de la fermentation. En effet, *E.coli* 0157 : H7 est parfaitement capable de se multiplier dans du lait fermenté, lorsque l'incubation se fait entre 25 et 37°C. Par contre, pas de croissance possible lorsque la température d'incubation est de 43°C (**Ogwaro et al., 2002**).

2.2. Conditions de production des laits crus et des fromages de chèvre

La fromagerie A utilisait les levains commerciaux, bien que le lait n'était pas parfaitement pasteurisé. Il existerait alors une flore endogène, de nature et en quantité pas toujours connues, qui participerait à l'acidification en même temps que le levain commercial. Un levain est un mélange de souches de bactéries lactiques adaptées à une fabrication donnée. Pour les fromages à pâte molle, ce sont les levains mésophiles (ex. *Lactococcus*, *Leuconostoc*) qui sont généralement utilisés (Fleet, 1999 ; Parente et Cogan, 2004). Du point de vue technologique, l'utilisation de deux types de « ferment », endogène et ajouté peut être à l'origine d'accidents de fabrication. En effet, la flore lactiqueensemencée sous forme de levains peut se trouver en compétition avec la flore endogène qui subsiste en absence de traitement efficace d'assainissement. Ces interactions peuvent être préjudiciables à la qualité des fromages. L'utilisation de levains micro-conditionnés congelés ou lyophilisés pour ensemençer directement les cuves individuellement, devraient également permettre d'éviter les manipulations, source de contamination.

La conduite de l'affinage est différente dans les deux fromageries : à basse température (18°-20°C) pour la fromagerie A et à température ambiante (entre 30-35°C). Même si dans le premier cas ces températures ne mettent pas totalement le produit à l'abri de la prolifération microbienne, les conditions d'affinage dans le second cas sont propices à une prolifération bactérienne, surtout de bactéries mésophiles qui trouveraient des conditions optimales pour leur croissance.

3. Conclusion partielle

Dans les exploitations bovines, les enquêtes de suivi ont révélé des pratiques différenciées en termes de races exploitées, de conduite du troupeau et de pratiques de traite. Cependant, les élevages ont pu être classés en 5 catégories ayant des pratiques plus au moins homogènes. La première catégorie comprenait des élevages hautement intensifs, 16 L/jour/vache et qui pratiquaient une traite mécanique propre. Les élevages de la deuxième catégorie avaient un niveau d'intensification moyen, 12 L/vache/jour en moyenne et une traite manuelle propre. La troisième catégorie regroupait des exploitations à intensification faible, 4 L/vache/jour et qui s'illustraient par une traite manuelle assez propre.

La quatrième catégorie comprenait les exploitations extensives, en moyenne de 2 L/vache/jour et qui pratiquaient une traite manuelle sale. Enfin, la dernière catégorie représentait des élevages hautement extensifs, à peine 1 L/vache/jour et ayant une traite manuelle très sale.

En ce qui concerne la transformation de lait de chèvre, l'offre est très atomisée pour la fromagerie A. Celle-ci s'approvisionnait auprès de 15 petites exploitations regroupant à la fois les bovins, les ovins et caprins. Le nombre de chèvres en lactation par exploitation était relativement faible, en moyenne 10. Ces chèvres étaient toutes de race locale élevées sous un mode extensif avec une production laitière de moins de 0,5 L/chèvre/jour. Les chèvreries s'illustraient par une traite manuelle sale. A l'opposé, la fromagerie B disposait de sa propre chèvrerie constituée de chèvres de race locale, de races importées, « Saneen et Alpine » et des croisées issues de deux. La conduite du troupeau était mixte. La production laitière était en moyenne de 2,5 L/jour/chèvre pour les races importées et de 1,5 L/jour/chèvre pour les métis et 1 L/jour/chèvre pour les chèvres locales. La traite était manuelle et propre.

Pour les laits de chèvre et de vache, la production n'était pas connectée au secteur industriel. Les laits produits subissaient une transformation de type fermier pour donner du lait fermenté de vache et les fromages de chèvre. A l'exception d'une diversité de matériaux utilisés pour la vaisselle laitière, les diagrammes de fabrication étaient simples et proches. La fermentation se faisait sur l'exploitation, sans ajout de levains industriels (sauf pour la fromagerie A) et les schémas de fabrication n'étaient pas standardisés. Ce manque de standardisation auquel s'ajoutaient les pratiques différenciées en termes de races exploitées et d'affouragement des animaux pouvait influencer sur les caractéristiques des produits.

II. ETUDE DE LA MICROFLORE DES ECHANTILLONS ANALYSES PAR LES METHODES DE MICROBIOLOGIE CLASSIQUE

1. Résultats

Les résultats des dénombrements bactériens sont exprimés en Unité Formant Colonie (ufc) par mL de lait ou par g de fromage. Pour les graphiques et certains tableaux, les numérations ont été données en échelle logarithmique (\log_{10}). Les résultats de la recherche (*Listeria* et *Salmonella*) sont exprimés par le substantif « absence » ou « présence ».

1.1. Microflore des laits crus de vache

Le tableau XIII donne les valeurs moyennes de chaque groupe de bactéries lactiques dans les échantillons de lait cru de vache. Il permet aussi de dégager les flores microbiennes majoritaires des laits crus en fonction des systèmes d'élevage.

Tableau XIII : Résultat de dénombrements des bactéries lactiques (moyenne \pm écart type en \log_{10} ufc/mL) des échantillons des laits crus de vache issus des 3 types d'élevage

Bactéries lactiques	Sys.intensif (n=12)	Sys.semi-intensif (n=12)	Sys.extensif (n=12)	Moy. générale	ESM	Valeur de P
<i>Lactococcus</i> sp.	5,19 \pm 0,56 ^a	5,52 \pm 0,24 ^a	5,71 \pm 0,52 ^b	5,47 \pm 0,50	0,083	0,035 (S)
<i>Lactobacillus</i> sp. à 30°C	5,19 \pm 0,50	5,20 \pm 0,27	5,33 \pm 0,48	5,24 \pm 0,42	0,071	0,678 (NS)
<i>Lactobacillus</i> sp. à 45°C	3,87 \pm 0,54 ^a	4,53 \pm 0,29 ^b	4,26 \pm 0,78 ^b	4,22 \pm 0,62	0,103	0,028 (S)
<i>Leuconostoc</i> sp.	3,20 \pm 0,36 ^a	4,04 \pm 0,82 ^b	4,46 \pm 0,34 ^b	3,90 \pm 0,75	0,126	0,000 (S)
<i>Enterococcus</i> sp.	2,89 \pm 0,58	3,11 \pm 1,17	3,62 \pm 0,66	3,21 \pm 0,88	0,146	0,115 (NS)

Sys.: système ; ESM : Erreur Standard Moyen , Moy. : moyenne, S : significatif, NS : non significatif

Les lactocoques suivis des lactobacilles mésophiles étaient dénombrés en majorité, en moyenne 5,47 \log_{10} ufc/mL de lait cru ($5,3 \cdot 10^5$ ufc/mL) pour *Lactococcus* sp. et 5,24 \log_{10} ufc/mL pour *Lactobacillus* sp. à 30°C. Les leuconostocs et les entérocoques étaient les moins représentés. Les laits crus des exploitations de type extensif suivi de ceux des exploitations semi-intensif ont été les plus riches en bactéries d'intérêt technologique.

En plus de ces quatre genres de bactéries lactiques, d'autres germes témoins, de la qualité hygiénique des procédés notamment la flore totale et *Escherichia coli* ont été retrouvés dans les échantillons de lait cru de vache analysés. La teneur moyenne en flore totale aérobie mésophile était de $5,30 \log_{10}$ ufc/mL ($8,1 \cdot 10^5$ ufc/mL). *Escherichia coli* a été dénombré dans 72 % des échantillons avec une moyenne de population de $1,26 \log_{10}$ ufc/mL de lait. D'autres germes potentiellement pathogènes comme les staphylocoques à coagulase positive ont été retrouvés dans 27 % des échantillons. Aucun échantillon de lait cru de vache ne contenait ni *Salmonella* sp. ni *Listeria monocytogenes*.

Tableau XIV : Teneurs moyennes en flore d'altération ou potentiellement pathogène dans les laits crus de vache

Germes		Systèmes d'exploitation		
		Intensif	Semi-intensif	Extensif
Flore aérobie mésophile	Fréquence d'apparition (%)	100%	100%	100%
	Charge moyenne (\log_{10} d'ufc/mL)	$4,90 \pm 0,83$	$4,75 \pm 0,81$	$6,24 \pm 0,23$
<i>Escherichia coli</i>	Fréquence (%) d'apparition	100%	33,33%	83,33%
	Charge moyenne (\log_{10} ufc/mL)	$1,97 \pm 0,63$	$0,45 \pm 0,69$	$1,36 \pm 1,05$
Staphylocoques à coagulase +	Fréquence d'apparition (%)	25%	25%	33,33%
	Charge moyenne (\log_{10} ufc/mL)	$1,48 \pm 0,21$	$2,52 \pm 0,31$	$2,57 \pm 0,64$

1.2. Microflore des laits fermentés de vache

Comme pour les laits crus, l'analyse de la composition microbiologique des échantillons de lait fermenté de vache a montré une richesse de ces derniers en flore lactique.

Tableau XV : Résultat de dénombrement des bactéries lactiques (moyenne \pm écart type en \log_{10} ufc/mL) des échantillons de lait fermenté issus des 3 types d'élevage

Germes	Sys.intensif (n=12)	Sys.semi-intensif (n=12)	Sys.extensif (n=12)	Moy. générale	ESM	Valeur de P
<i>Lactococcus</i> sp.	7,07 \pm 0,28 ^a	7,84 \pm 0,45 ^b	8,66 \pm 0,31 ^c	7,86 \pm 0,74	0,123	0,000 (S)
<i>Lactobacillus</i> sp. à 30°C	7,01 \pm 0,45 ^a	7,80 \pm 0,41 ^b	8,87 \pm 0,27 ^c	7,83 \pm 0,79	0,131	0,000 (S)
<i>Lactobacillus</i> sp. à 45°C	6,02 \pm 0,65 ^a	6,72 \pm 0,54 ^b	8,04 \pm 0,52 ^c	6,93 \pm 1,01	0,169	0,000 (S)
<i>Leuconostoc</i> sp.	4,76 \pm 0,78 ^a	6,04 \pm 0,66 ^b	7,53 \pm 0,43 ^c	6,11 \pm 1,30	0,126	0,000 (S)
<i>Enterococcus</i> sp.	4,64 \pm 0,48 ^a	5,35 \pm 0,71 ^b	6,01 \pm 0,82 ^c	5,34 \pm 0,87	0,347	0,000 (S)

Sys.: système ; ESM : Erreur Standard Moyen , Moy. : moyenne, S : significatif, NS : non significatif

La flore lactique des laits fermentés était quantitativement marquée par les lactocoques et les lactobacilles mésophiles dont les numérations moyennes atteignaient 10^7 ufc/mL. Les genres *Leuconostoc* et *Enterococcus* étaient les moins représentés. Dans tous les échantillons coexistaient les lactobacilles mésophiles et thermophiles et ce, dans des proportions importantes. Pour les quatre genres de bactéries lactiques, la population était maximale dans les échantillons issus des exploitations de type extensif. Les laits fermentés des exploitations intensives étaient les moins riches en bactéries d'intérêt technologique.

En ce qui concerne les flores d'altération ou potentiellement pathogènes, *Escherichia coli* a été retrouvé dans tous les échantillons issus des ateliers fermiers des élevages intensifs et extensifs et dans 83 % des échantillons prélevés dans les ateliers fermiers des exploitations semi-intensives. Les staphylocoques à coagulase positive ont été dénombrés respectivement dans 33%, 25 % et 58 % des échantillons prélevés dans les ateliers de types intensif, semi-intensif et extensif. Aucun échantillon de lait fermenté n'était contaminé ni par *Salmonella* sp. ni par *Listeria monocytogenes*.

Le tableau XVI indique le nombre d'échantillons contenant les flores d'altération ou potentiellement pathogènes dans chaque système ainsi que leurs valeurs moyennes dans les échantillons contaminés.

Tableau XVI : Teneurs moyennes en flore d'altération ou potentiellement pathogène dans les laits fermentés

Systèmes d'exploitations fermières	<i>Escherichia coli</i>		Staphylococoques à coagulase positive	
	Fréquence d'apparition	Charge moyenne (\log_{10} ufc/mL)	Fréquence d'apparition	Charge moyenne (\log_{10} ufc/mL)
Système intensif	100%	2,31±0,56	33,33%	2,31±1,13
Système semi-intensif	83,33%	1,76±1,20	25%	2,37±0,21
Système extensif	100%	3,04±0,74	58,33%	3,24±0,41

1.3. Microflore des laits crus et des fromages de chèvre

Le tableau XVII donne les valeurs moyennes de chaque groupe microbien dans les échantillons de lait et fromages issus de ces laits.

Tableau XVII : Moyenne des numérations en différents groupes bactériens dans les échantillons de lait et fromages de chèvre

Paramètres	Laits de fabrication		Fromages	
	Fréquence (%)	Charge moyenne (\log_{10} ufc/mL)	Fréquence (%)	Charge Moyenne (\log_{10} ufc/g)
Flore totale aérobie à 30°C	100	6,70±0,19	Non réalisé	Non réalisé
<i>Lactococcus</i> sp.	100	7,54±0,86	100	8,01±0,53
<i>Lactobacillus</i> sp. à 30°C	100	7,00±0,45	100	8,00±0,77
<i>Lactobacillus</i> sp. à 45°C	100	5,34±0,25	100	6,97±0,73
<i>Leuconostoc</i> sp.	100	5,26±0,25	100	4,36±0,57
<i>Enterococcus</i> sp.	100	4,67±0,84	100	5,20±0,76
<i>Escherichia coli</i>	100	3,73±0,10	75	3,18±0,83
<i>Staphylococcus</i> sp.	100	3,28±0,66	50	2,87±0,84

Les analyses montraient que la flore lactique était quantitativement marquée par les lactocoques qui atteignaient en moyenne 7,54 \log_{10} ufc/mL. Les lactobacilles mésophiles représentaient le second groupe de bactéries lactiques majoritairement retrouvées.

Les lactobacilles thermophiles étaient également présents dans tous les échantillons. Dans les fromages, les lactobacilles mésophiles étaient dénombrés en majorité. Il en était de même pour les entérocoques dont les numérations étaient plus importantes que celles des *Leuconostoc* (respectivement $5,74.10^5$ ufc/g contre $4,20.10^4$ ufc/g).

En ce qui concerne l'hygiène des produits, *Escherichia coli* et des bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* ont été retrouvées dans tous les échantillons de lait cru. Un seul des échantillons de lait analysés était contaminé par *Salmonella* sp. Dans les fromages, *Escherichia coli* a été dénombrée dans 6 des 8 échantillons avec une charge moyenne de $2,91.10^3$ ufc/g. L'échantillon le plus chargé contenait 10^4 ufc/g. Les staphylocoques ont été retrouvés dans 50% des échantillons de fromage. Un échantillon de fromage était contaminé par *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp. n'a été détecté dans aucun fromage.

Concernant les dénombrements bactériens chez les deux producteurs, les tableaux XVIII et XIX montrent une variation des dénombrements moyens des groupes bactériens au niveau des différents lots de fabrication.

Tableau XVIII : Moyenne des numérations des différents groupes bactériens des échantillons de la fromagerie A

Microorganismes (log ₁₀ ufc/mL)	1 ^{er} lot			2 ^{ème} lot			3 ^{ème} lot			4 ^{ème} lot		
	LC	LT	From.	LC	LT	From.	LC	LT	From.	LC	LT	From.
<i>Lactococcus</i> sp.	7,70	3,70	7,70	6,30	3,00	8,48	7,00	3,30	8,60	7,95	3,0	8,70
<i>Lactobacillus</i> sp. à 30°C	7,48	3,48	7,48	7,00	2,70	8,95	6,95	4,30	8,85	7,30	3,00	8,48
<i>Lactobacillus</i> sp. à 45°C	5,30	2,48	6,60	5,30	2,70	7,90	5,60	2,30	7,30	5,70	4,00	7,48
<i>Leuconostoc</i> sp.	5,00	3,70	3,60	5,48	3,30	4,70	5,00	3,70	3,78	5,30	2,30	4,30
<i>Enterococcus</i> sp.	4,95	4,70	5,30	5,30	4,95	4,70	5,60	3,38	4,30	5,70	4,00	4,95
<i>Escherichia coli</i>	4,48	ND	4,00	4,95	ND	3,78	4,60	ND	3,70	4,30	0,84	3,30
Staphylocoques à coagulase positive	3,30	ND	3,70	2,70	0,69	ND	4,00	ND	ND	2,48	ND	3,48

LC = lait cru, LT = lait thermisé, From. = fromage ; ND = non dénombré

Tableau XIX : Moyennes des numérations des différents groupes bactériens des échantillons de la fromagerie B

Microorganismes	1 ^{er} lot		2 ^{ème} lot		3 ^{ème} lot		4 ^{ème} lot	
	LC	Fromage	LC	Fromage	LC	Fromage	LC	Fromage
<i>Lactococcus</i> sp.	6,48	7,48	8,60	7,30	8,48	7,95	7,78	7,90
<i>Lactobacillus</i> sp. à 30°C	6,00	7,00	7,00	8,48	7,30	7,48	7,00	7,30
<i>Lactobacillus</i> sp. à 45°C	5,48	5,70	5,00	7,48	5,00	6,30	5,30	7,00
<i>Leuconostoc</i> sp.	5,60	4,30	4,95	5,00	5,30	4,85	5,48	4,90
<i>Enterococcus</i> sp.	3,60	6,30	4,00	4,48	4,48	5,30	3,70	6,30
<i>Escherichia coli</i>	2,70	ND	4,00	2,00	2,00	2,30	2,85	ND
Staphylocoques à coagulase positive	3,70	ND	4,30	2,00	2,85	2,30	2,90	ND

LC : lait cru ; ND : non dénombré

2. Discussion

2.1. Microflore lactique des laits crus de vache

Les quatre genres de bactéries lactiques, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, et *Leuconostoc*, habituellement présents dans les produits laitiers (Stiles *et al.*, 1997) ont été dénombrés dans tous nos échantillons. Les lactocoques ($5,3 \cdot 10^5$ ufc/mL) suivis des lactobacilles ($2,9 \cdot 10^5$ ufc/mL) constituaient la flore lactique dominante des laits crus analysés. Ce résultat diffère de ceux des laits crus issus des troupeaux bovins français (Choisy *et al.*, 1997b ; Desmasures *et al.*, 1997a ; Henri-Dubernet *et al.*, 2004 ; Michel *et al.*, 2001) dans lesquels les lactobacilles constituaient la flore majoritaire.

Les dénombrements obtenus dans cette étude sont supérieurs à ceux observés dans des laits des troupeaux européens dont les taux dépassaient rarement 10^4 ufc/mL (Aquilanti *et al.*, 2006 ; Bouton, 2005 ; Michel, 2001). L'appauvrissement des laits issus des troupeaux européens en flore s'expliquerait par des mesures d'hygiène rigoureuses dans les élevages et pendant la traite (Michel *et al.*, 2001 ; Michel *et al.*, 2005 ; Tormo *et al.*, 2011b). En effet, dans l'objectif d'être conforme aux normes européennes de plus en plus strictes, les éleveurs adoptent des techniques de désinfection se traduisant par une diminution de la microflore indigène composée aussi bien de microorganismes indésirables que de ceux d'intérêt technologique (Callon *et al.*, 2007, Delbès *et al.*, 2007).

Par conséquent, dans cette étude, les charges élevées en bactéries lactiques dans les laits crus s'expliqueraient par les pratiques plus respectueuses des flores du trayon (absence de lavage ou le lavage collectif, l'absence de post trempage et la non élimination des premiers jets) observées dans les élevages suivis. Le même constat avait été fait auparavant dans les troupeaux français (**Callon et al., 2007 ; Michel et al, 2001**). Cependant, même si ces pratiques concourent à l'obtention des laits crus riches en flore d'intérêt technologique, une hygiène minimale reste requise pour éviter la présence des germes potentiellement pathogènes ou d'altération dans le lait.

Les comparaisons inter-systèmes des numérations en bactéries lactiques montrent des différences significatives entre les teneurs lactocoques et en leuconostocs des laits issus des exploitations de type intensif et extensif. Ces derniers étaient les plus riches en ces deux groupes de bactéries ($p = 0,035$ pour le lactocoques et $p = 0,000$ pour les leuconostocs). Les niveaux élevés en lactocoques dans les exploitations de type extensif en comparaison à ceux des exploitations intensif, trouvent leur explication dans les pratiques beaucoup plus respectueuses de la flore indigène du lait (traite manuelle et sans lavage du trayon, non élimination des premiers jets) en vigueur dans les élevages extensifs. En effet, une analyse portant sur la composition microbienne des éléments en contact direct avec le lait lors de la traite, a identifié la surface des trayons comme étant l'élément hébergeant la plus grande diversité des flores microbiennes avec prédominance des bactéries d'intérêt technologique (**Michel et al., 2006**). La traite en plein air, souvent même sur pâturage observée dans les élevages extensifs augmenterait la probabilité d'avoir une charge élevée en lactocoques dont la principale source est le fourrage (**Dellaglio et al., 1994**).

Une différence significative ($p = 0,028$) a été également observée au niveau des teneurs en lactobacilles thermophiles dans les laits provenant des exploitations semi-intensives et intensives, les laits prélevés des élevages semi-intensifs étant plus riches en lactobacilles thermophiles. La charge élevée en lactobacilles thermophiles dans les élevages semi-intensifs serait due à des températures ambiantes plus élevées dans les élevages semi-intensifs (Kaolack) que dans les élevages intensifs (zone des Niayes et banlieue de Dakar).

2.2. Microflore lactique des laits fermentés de vache

Un stockage à température ambiante, sans ajout de ferment (acidification spontanée) permet d'obtenir au bout de 24 heures des laits fermentés avec des teneurs élevées en bactéries lactiques. Les plus importantes quantitativement ont été les lactocoques et les lactobacilles mésophiles, respectivement $7,86 \pm 0,74 \log_{10}$ ufc/mL et $7,83 \pm 0,79 \log_{10}$ ufc/mL de lait pour les lactobacilles mésophiles. Les lactobacilles thermophiles ont été dénombrés autour de $6 \pm 1, 01 \log_{10}$ ufc/mL. Comme pour les laits crus, les leuconostocs et les entérocoques étaient les moins représentés.

Les teneurs en différentes bactéries lactiques dans les laits fermentés étudiés étaient proches de celles des autres laits fermentés traditionnels africains. Dans le « Nyarmie », un lait fermenté traditionnel produit au Ghana, les lactobacilles mésophiles ont été dénombrés entre $2,3 \cdot 10^7$ et $1,3 \cdot 10^8$ ufc/mL, les thermophiles entre $1,7 \cdot 10^8$ et $2,6 \cdot 10^8$ ufc/mL (**Obodai et Dodd, 2006**). **Abdelgadir et al. (1998)** ont travaillé sur le « Rob », un autre lait fermenté traditionnel soudanais dans lequel les lactobacilles mésophiles atteignaient 10^8 ufc/mL. En Afrique du Sud, **Beukes et al. (2001)** ont dénombré dans un lait fermenté local, les lactobacilles en des quantités allant de $2,6 \cdot 10^8$ à $1,28 \cdot 10^9$ ufc/mL pour les mésophiles et $7,6 \cdot 10^6$ à $7,65 \cdot 10^8$ ufc/mL pour les thermophiles. Dans le Kule naoto, un lait fermenté traditionnel produit par les Maasai du Kenya, les populations de lactocoques et des lactobacilles avoisaient également les 10^8 ufc/mL (**Mathara et al., 2004**). C'est en Egypte, dans le « Zabady », un lait fermenté traditionnel, que les plus faibles teneurs en lactobacilles ont été notées, de l'ordre de 10^4 ou nettement inférieures à 1 ufc/mL (**El-Baradei et al., 2008**).

L'analyse de la variance montre que le facteur « système d'élevage » a un effet très significatif ($p=0,000$) sur les 5 groupes qui constituent la flore d'intérêt technologique. Les laits fermentés issus des exploitations de type extensif étaient plus riches que ceux issus des élevages semi-intensifs, eux-mêmes plus riches que ceux des exploitations de type intensif. Cette variation pourrait être associée d'une part à des facteurs climatiques notamment la température ambiante, mais aussi aux matériels utilisés pour la fermentation du lait. En effet, les trois systèmes d'élevage recourent les trois zones éco-climatiques avec des variations de température ambiante.

Pendant la période d'étude (janvier-mars 2008), les températures moyennes étaient respectivement de 28°C, 35°C et 40°C en zone intensive, semi-intensive et extensive (données fournies par le service de météorologie du Sénégal). L'utilisation des Calebasses en bois pour fermenter le lait, pratique généralisée dans les élevages extensifs et en partie dans les élevages semi-intensifs expliquerait également les différences observées. De part sa surface poreuse, la Calebasse en bois offre plus de possibilités aux bactéries lactiques qui vont s'implanter de façon durable en surface de cette vaisselle lactière. Cette colonisation du matériel de fermentation est facilitée par la capacité des bactéries lactiques à coloniser une surface grâce à l'excrétion d'un gel glucidique extracellulaire appelé exopolysaccharide. Ce dernier assure un lien physique entre les cellules microbiennes et la surface à coloniser (**Zottola, 1994**). Un tel schéma d'organisation de plusieurs microorganismes sur une surface colonisée est appelé biofilm. Lorsque la surface colonisée est lavée sommairement, la probabilité de voir les microorganismes s'y implanter augmente (**Licitra et al., 2007**).

Sur tout un autre plan, certaines bactéries lactiques présentes dans les échantillons analysés pourraient présenter un intérêt dans la biopréservation des aliments. En effet, du point de vue hygiénique, dans les produits laitiers fermentés, les bactéries lactiques participent au contrôle du développement des bactéries pathogènes (**Millet et al., 2007**). L'inhibition des bactéries lactiques envers les germes d'altération ou pathogènes est due à la production des substances antagonistes comme l'acide lactique, l'acide acétique, le peroxyde d'hydrogène (**Benkerroum et al., 2002 ; Holzappel et al., 1995**). Cette propriété des bactéries lactiques est valorisée dans la conservation des produits alimentaires à haute valeur ajoutée (saumon, filet de poisson etc.).

Sur le plan nutritionnel, l'efficacité de certaines bactéries lactiques ingérées avec les laits fermentés dans la prévention des perturbations digestives liées à l'antibiothérapie a été prouvée (**Beausoleil et al., 2007 ; Tuohy et al., 2007**). D'autres bactéries lactiques produisent des bactériocines qui sont des agents anti-bactériens (**De Vuyst et Vandamme, 1994, Naidu et al., 1999, Tuohy et al., 2007**).

Enfin dans le domaine laitier, la richesse et la biodiversité des microorganismes des laits fermentés auraient une action déterminante dans la « typicité » de ces produits. Ces derniers auraient des caractéristiques organoleptiques (texture, arôme) bien différentes de laits fermentés « industriels ».

2.3. Microflore lactique de laits et fromages de chèvre

Dans les fromages étudiés et fabriqués à partir du lait de chèvre, les lactocoques et les lactobacilles constituaient la flore dominante. Ces résultats corroborent les études antérieures sur les fromages simulaires (Casalta, 2001 ; Choisy *et al.*, 1997 ; Colombo *et al.*, 2010 ; Desmaures, 1995 ; Henri-Dubernet *et al.*, 2004 ; Ouadghiri *et al.*, 2005).

Du point de vue quantitative, les résultats obtenus sont proches de ceux du Jben, fromage traditionnel marocain où les lactobacilles variaient de 10^8 - 10^9 ufc/g (Benkerroum *et al.*, 2003 ; Ouadghiri *et al.*, 2005) et ceux du Camembert dans lequel les numérations en lactocoques et en lactobacilles ont été respectivement de 10^9 et 10^7 ufc/g (Choisy *et al.*, 1997 ; Desmaures, 1995 ; Henri-Dubernet *et al.*, 2004).

Dans le Venaco, fromage fabriqué en Corse, la population des lactocoques atteignait également 10^9 ufc/g et celle des lactobacilles était 10^7 ufc/g (Casalta, 2003). Les numérations observées dans cette étude sont cependant supérieures à celles du Provolone, un autre fromage italien dans lequel les bactéries lactiques ont été dénombrées à 10^5 - 10^6 ufc/g (Aponte *et al.*, 2008) et ceux des fromages de Serbie (Pudja *et al.*, 2008) où les lactocoques avoisinaient les 10^6 ufc/g.

Dans les fromages étudiés, les numérations en bactéries des genres *Enterococcus* et *Leuconostoc* dans les laits de fabrication et dans les fromages ont montré que la population d'entérocoques dans les fromages avait augmenté par rapport au lait cru alors que celle des *Leuconostoc* avait diminué. Tornadijo *et al.* (2001) avaient observé les mêmes effets dans un fromage type pâte molle. Du point de vue quantitative, les numérations en bactéries *Enterococcus* sont simulaires à celles dénombrées dans le Jben, soit 10^5 ufc/g (Benkerroum *et al.*, 2003 ; Ouadghiri *et al.*, 2005).

2.4. Microflore d'altération et/ou potentiellement pathogène dans les échantillons analysés

Des germes témoins de la qualité et de la sécurité des produits (flore totale, *E.coli* et Staphylocoques présumés pathogènes ont été retrouvés dans certains échantillons analysés. Les laits crus de vache avaient une population moyenne en flore mésophile aérobie totale $5,30 \pm 0,95 \log_{10}$ ufc/mL. Le niveau moyen en flore totale dans les échantillons de lait cru de chèvre était de $6,70 \pm 0,19 \log_{10}$ ufc/mL. Les niveaux de flore totale étaient proches de ceux des laits issus des troupeaux du continent africain. Le niveau de flore aérobie mésophile totale dans les laits issus des troupeaux du Zimbabwe qui était de $5,6 \pm 4,7 \log_{10}$ cfu/mL (**Mhone et al., 2011**) et marocains, de l'ordre de $6 \log_{10}$ ufc/mL (**Afif et al., 2008**). Une étude faite sur les échantillons de laits crus issus des fermes italiennes avait également dénombré des niveaux équivalents en flore totale (**Franciosi et al., 2009**). Cependant, les résultats obtenus dans cette étude étaient supérieurs à ceux des laits issus des fermes françaises, soit environ 10^4 ufc/mL (**Desmaures et al., 1997a ; 1997b ; Michel et al., 2001 ; Tormo et al., 2006**).

Du point de vue réglementaire, tous les échantillons issus des exploitations de type extensif, n'étaient pas conformes aux exigences des normes européennes qui stipulent que la moyenne géométrique des laits matière première en flore totale constatée sur une période de 3 mois, avec au moins un prélèvement par mois, ne doit pas dépasser $5 \log_{10}$ ufc/mL (**Règlement CE 853-2004**). Or dans cette étude, la moyenne en flore totale des laits issus des exploitations de type extensif était de $6,24 \pm 0,23 \log_{10}$ ufc/mL.

La fréquence d'*E.coli* dans les laits crus et fermentés de vache a été respectivement de 72,2 % et 94,4 %. Ces observations sont proches de celles obtenues auparavant sur des échantillons crus de lait de vache produit au Sénégal par **Breurec et al. (2010)** pour qui la fréquence d'*E.coli* était de 85,4 % dans le lait cru et de 72,7% dans le lait fermenté. Par contre, ces mêmes auteurs avaient trouvé des niveaux moyens beaucoup plus élevés que dans notre étude, soit $6 \log_{10}$ ufc/mL contre respectivement $1,26 \pm 1,01 \log_{10}$ ufc/mL et $2,37 \pm 1,00 \log_{10}$ ufc/mL respectivement pour les échantillons de lait cru et fermenté analysés dans cette étude.

Cependant, les résultats obtenus diffèrent de ceux des laits crus produits au Ghana (**Addo et al., 2011**) et au Zimbabwe (**Mhone et al., 2011**) et dans lesquels la prévalence d'*E. coli* était respectivement de 11, 2% et 40,8%.

Les staphylococoques à coagulase positive ont été dénombrés dans 28 % des échantillons de laits crus de vache et 38% de laits fermentés. Ces observations corroborent une étude antérieure réalisée par **Breurec et al. (2010)** et dans laquelle les germes cités avaient été dénombrés dans 26% des échantillons de lait cru. Par contre, nos observations sont différentes de celles faites en Norvège et qui avaient révélé une prévalence de *S. aureus* dans les laits crus de vache de 47,3% (**Jakobsen et al., 2011**).

Les données des tableaux XIV et XVI suggèrent les laits crus et fermentés de vache issus des exploitations du type semi-intensif étaient moins chargés en *E.coli* et en staphylocoques à coagulase positive, donc de meilleure qualité que ceux des élevages intensifs, eux-mêmes meilleurs que ceux des élevages de type extensif. Cet état de fait trouverait son explication dans la bonne gestion de la santé des vaches laitières notamment la prévention des mammites et l'application des règles élémentaires d'hygiène lors de la traite dans les élevages intensifs et semi-intensifs. Ce résultat est en adéquation avec celui de **Goldberg et al. (1992)**.

Des germes témoins de la qualité et de la sécurité des produits (*E.coli* et Staphylocoques présumés pathogènes) ont été retrouvés dans certains échantillons analysés. Les données de ce tableau suggèrent que les laits crus et fermentés de vache issus des exploitations du type semi-intensif étaient moins chargés en *E.coli* et en staphylocoques à coagulase positive, donc de meilleure qualité que ceux des élevages intensifs, eux-mêmes meilleurs que ceux des élevages de type extensif. Cet état de fait trouverait son explication dans la bonne gestion de la santé des vaches laitières notamment la prévention des mammites et l'application des règles élémentaires d'hygiène lors de la traite dans les élevages intensifs et semi-intensif mais aussi dans la taille du troupeau qui pourrait constituer un facteur multiplicateur de la contamination, les échantillons analysés étant des laits de mélange. De la même façon, les numérations moyennes en staphylocoques et en *E.coli* dans les laits fermentés étaient légèrement supérieures à ceux des laits crus ayant servi à leur fabrication. L'une des explications possibles serait une contamination secondaire due aux manipulateurs.

Une acidification faible et lente, 24h à une température avoisinant les 30°C ; pourraient être également à l'origine de la persistance, voire l'augmentation des germes cités dans les laits fermentés. Cette observation corrobore une étude antérieure qui a montré que même en présence d'un starter sélectionné, *E.coli* était capable de croître dans du lait fermenté, lorsque l'incubation se faisait entre 25 et 37°C. Néanmoins, lorsque la température d'incubation était de 43°C, il n'y avait pas de croissance possible (**Ogwaro et al., 2002**)

En ce qui concerne la qualité des laits et fromages de chèvre, les staphylococoques à coagulase positive ont été identifiées dans la totalité des laits crus de chèvre.

Des observations faites en Norvège avaient révélé une prévalence de *S. aureus* de 98,8%, (**Jakobsen et al., 2011**). Dans les fromages, les staphylococoques ont été retrouvés dans 50 % des échantillons et leur charge moyenne ($2,87 \pm 0,84 \log_{10}$ ufc/g) avait également diminué par rapport aux laits crus ayant servi à leur fabrication. La diminution de la teneur en staphylococoques dans les fromages par rapport au lait de fabrication, avait été observée lors de la fabrication des fromages égyptiens « Domiati » (**El-Baradei, 2008**). Une acidification poussée combinée à l'augmentation du taux de chlorure de sodium et à une diminution de l'activité de l'eau (A_w) seraient les causes de la diminution des staphylococoques à coagulase positive dans les fromages (**Meyrand et Vernozzy-rozand, 1999**).

La thermisation, pratique courante dans la fromagerie A, a permis de réduire de façon significative la population d'*E.coli* et de staphylococoques présumés pathogènes. Toutefois, ces germes ont été retrouvés dans les fromages. Deux hypothèses non exclusives peuvent expliquer ce constat. La première revient à supposer que le chauffage n'a eu qu'un effet transitoire sur la viabilité des bactéries. Celles-ci ont été stressées par la chaleur, les moins résistantes ont été éliminées et les plus résistantes ont survécu à des concentrations en deçà des seuils de détection par dénombrement bactérien (moins d'une unité formant colonie par mL de lait). Ces bactéries présentes en très faible nombre, ont pu se multiplier dans le fromage, lorsque les conditions sont devenues favorables. La deuxième hypothèse consiste à considérer que le traitement thermique a réellement été efficace mais que les populations microbiennes sont réapparues à la suite d'une contamination secondaire par des manipulations malpropres lors de la fabrication des fromages.

3. Conclusion partielle

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a mis en évidence la richesse en bactéries lactiques des laits et produits laitiers fermentés produits au Sénégal :

- ✚ les dénombrements moyens des lactobacilles cultivables à 30°C étaient de $2,86.10^5$ ufc/mL dans le lait cru de vache et de $1,37.10^7$ ufc/mL dans celui de chèvre. Dans les laits fermentés de vache et les fromages de chèvre, les lactobacilles mésophiles atteignaient respectivement $2,17.10^8$ ufc/mL de lait et $2,86.10^8$ ufc/g de fromage ;
- ✚ la population des lactobacilles thermophiles (cultivables à 45°C) était de $4,16.10^4$ ufc/mL de lait de vache, de $2,50.10^5$ ufc/mL de lait de chèvre, de $2,21.10^7$ ufc/g de fromage de chèvre et de $7,12.10^7$ ufc/mL de lait fermenté de vache ;
- ✚ les lactocoques étaient dénombrés à hauteur de $5,35.10^5$ ufc/mL dans le lait cru de vache, à $1,14.10^8$ ufc/mL de lait de chèvre, à $2,20.10^8$ ufc/mL de lait fermenté de vache et à $1,84.10^8$ ufc/g de fromage de chèvre ;
- ✚ les leuconostocs et les entérocoques étaient les moins représentés, soit respectivement $2,35.10^4$ ufc/mL et $7,62.10^3$ ufc/mL de lait de vache. Dans les laits fermentés, les numérations moyennes en leuconostocs atteignaient $1,88.10^7$ ufc/mL, celles d'entérocoques $1,30.10^6$ ufc/mL. Dans les fromages, les leuconostocs étaient évalués à $4,20.10^4$ ufc/g et les entérocoques à $5,74.10^5$ ufc/g de fromage.

Ces résultats suggèrent que les lactocoques et les lactobacilles, éléments généralement constitutifs des levains industriels pour la production de laits fermentés, ne sont pas les seuls acteurs de la fermentation spontanée du lait au Sénégal. Ils cohabitent souvent dans des proportions importantes avec les *Leuconostoc* et les entérocoques. Par ailleurs, nous avons montré que dans les échantillons analysés, coexistaient des espèces bactériennes faisant habituellement partie des levains mésophiles et thermophiles.

Pour les quatre genres de bactéries lactiques (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*) retrouvés, les niveaux les plus élevés étaient ceux des échantillons issus des exploitations extensives. Les laits fermentés des exploitations intensives étaient les moins riches en bactéries lactiques. Par ailleurs, des germes potentiellement pathogènes, comme les staphylocoques à coagulase positive, ont été retrouvés dans certains échantillons.

Ces germes pourraient être issus des laits de fabrication ou apportés par le personnel. Il est aussi probable que ces germes aient perduré à chaque fabrication, si bien qu'ils ont fini par s'intégrer à l'écosystème de l'atelier de fabrication. Aucun échantillon de lait de vache n'était contaminé ni par *Salmonella* sp. ni par *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp. a été retrouvé dans un échantillon de lait de chèvre et *Listeria monocytogenes* dans un échantillon de fromage.

III. ETUDE DE LA MICROFLORE DES ECHANTILLONS ANALYSES PAR LES METHODES MOLECULAIRES

Les méthodes moléculaires ont permis de faire une analyse beaucoup plus fine des populations bactériennes présentes dans les laits et les produits laitiers fermentés artisanaux produits au Sénégal. L'ADNr bactérien a été extrait directement à partir des matrices laitières (lait cru, lait fermenté et fromage) puis une double PCR (Nested-PCR) a permis d'amplifier le fragment V3 de l'ADNr. Les amplicons ont été séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide avec un gradient dénaturant de température (TTGE) pour les espèces bas GC % et dans un gradient dénaturant chimique d'urée/formamide (DGGE) pour les espèces haut GC %. Les espèces minoritaires ont été mises en évidence par des PCR spécifiques, leur séparation a été faite sur gel d'agarose à 2 %.

1. Résultats

Sur chaque profil électrophorétique des amplicons provenant des fragments de la région V3 de l'ADNr 16S, une bande correspond à une espèce (*espèce x*) ou à un groupe d'espèces taxonomiquement proches (*espèce y/espèce z/...*). L'intensité ou la largeur de la bande renseigne également sur la proportion relative de l'espèce dans l'écosystème. Seules les espèces dominantes (> à 0,1 %) ont été détectées.

1.1. Microflore des laits crus de vache

Les profils électrophorétiques des échantillons de laits crus étudiés sont présentés dans la figure 24 pour les espèces bas GC % (TGGE) et la figure 25 pour les espèces haut GC % (DGGE).

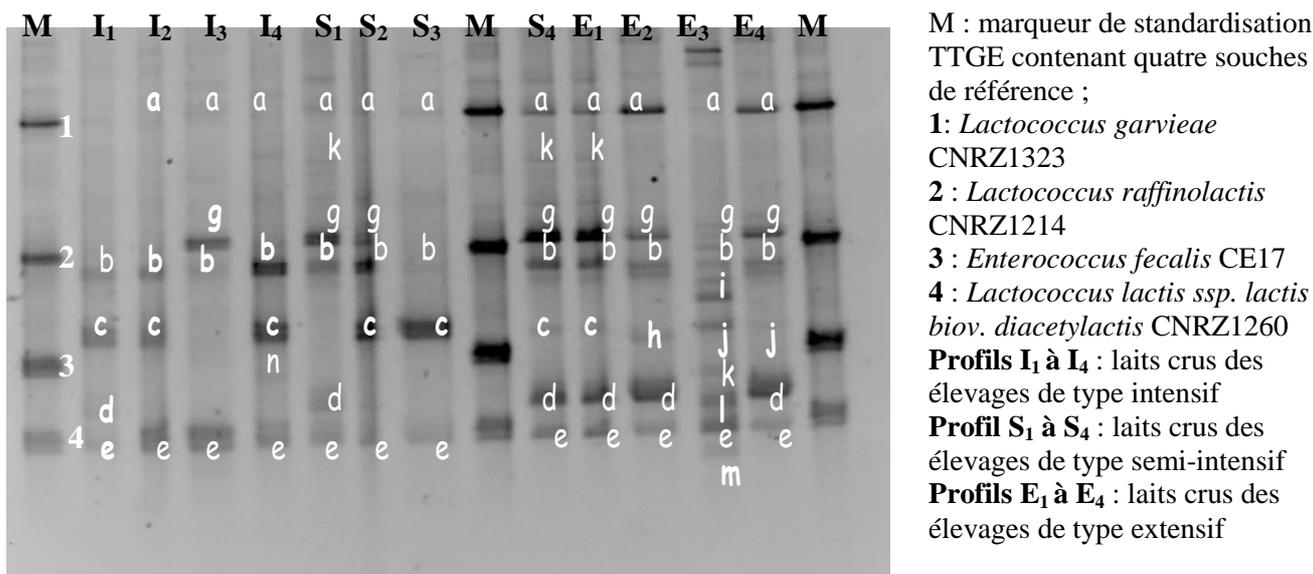
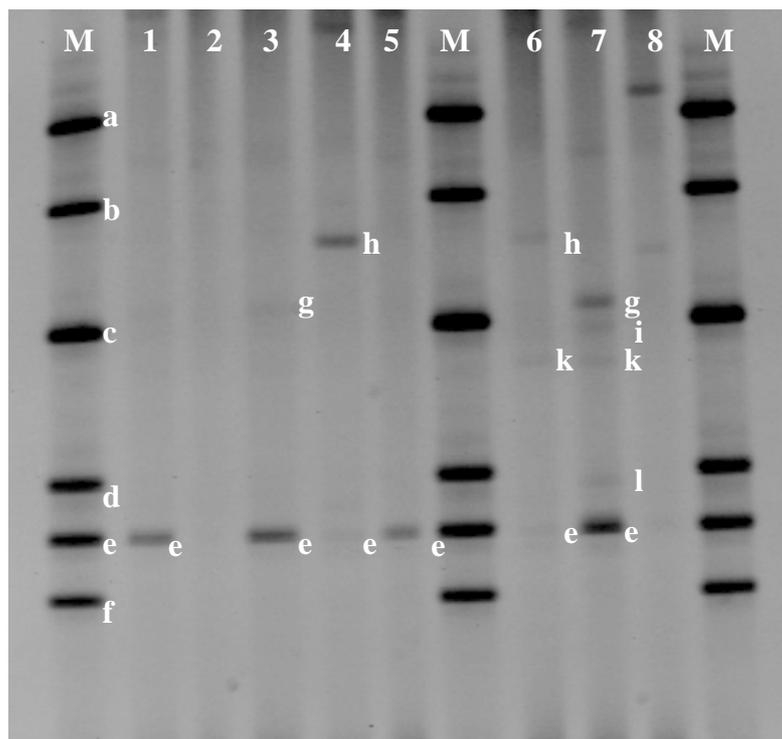


Figure 24 : Profils TTGE des amplicons V3 de l'ADNr 16S des échantillons de laits crus de vache

a : *Lactococcus garvieae* ; **b** : *Enterococcus faecium/hirae/durans* ; **c** : *Pediococcus pentosaceus* ; **d** : *Staphylococcus auricularis* ; **e** : *Lactococcus lactis* ; **g** : *Staphylococcus capitis/epidermis/cohnii/equarum*, **h** : *Streptococcus hominis/Lactococcus plantarum* ; **i** : *Lactobacillus acidophilus* ; **j** : *Streptococcus uberis* ; **k** : *Staphylococcus chromogenes* ; **l** : *Micrococcus haemolyticus* ; **m** : *Streptococcus thermophilus*



Profil M = marqueur de standardisation DGGE contenant six souches de référence :

a : *Bacillus pumilus* ATCC 7725,
b : *Klebsiella oxytoca* ATCC 103434T,
c : *Kytococcus sedentarius* CNRZ 880T,
d : *Arthrobacter citreus* CNRZ 928T,
e : *Kocuria kristinae* CNRZ872,
f : *Propionibacterium jensenii* Z87.

Profils 1 à 3 : laits crus des élevages de type intensif, **Profil 4 à 6** : laits crus des élevages de type semi-intensif., **Profils 7 et 8**: laits crus des élevages de type extensif

Figure 25 : Profils DGGE (espèces haut GC %) des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de lait cru de vache

g : *Corynebacterium casei*,
h : *Brevibacterium linens*/*Clostridium flavescens*,
k : *Clostridium fermentans*, **l** : *Corynebacterium amonio*,
l : *Arthrobacter citreus*

Les profils DGGE des laits crus avaient peu de bandes et donc peu d'espèces par rapport aux profils TTGE. L'espèce *Kocuria kristinae* (**bande e**) a été détectée dans presque tous les échantillons de lait cru. *Corynebacterium casei* (**bande g**) a été retrouvé dans deux échantillons issus des élevages intensif et extensif. *Brevibacterium linens*/*Clostridium flavescens* (**bande h**) a été mis en évidence dans deux échantillons. *Arthrobacter citreus* (**bande l**) et *Corynebacterium amoniogenes* ont été retrouvés dans un échantillon de lait cru, prélevé dans une exploitation de type extensif.

1.2. Microflore des laits fermentés de vache

Les profils électrophorétiques des échantillons de laits fermentés de vache sont présentés dans la figure 26 pour les espèces bas GC % (TTGE) et la figure 27 pour les espèces haut GC % (DGGE).

Le profil M=marqueur de standardisation TTGE avec les 4 souches de référence, de haut en bas *Lactococcus garvieae* CNRZ1323, *Lactococcus raffinolactis* CNRZ1214, *Enterococcus faecalis* CE17 et *Lactococcus lactis ssp. lactis biov. diacetylactis* CNRZ1260.

Profils I₁ à I₄ : laits fermentés des élevages de type intensif

Profil S₁ à S₄ : laits fermentés des élevages de type semi-intensif

Profils P₁ à P₄ : laits fermentés des élevages de type intensif

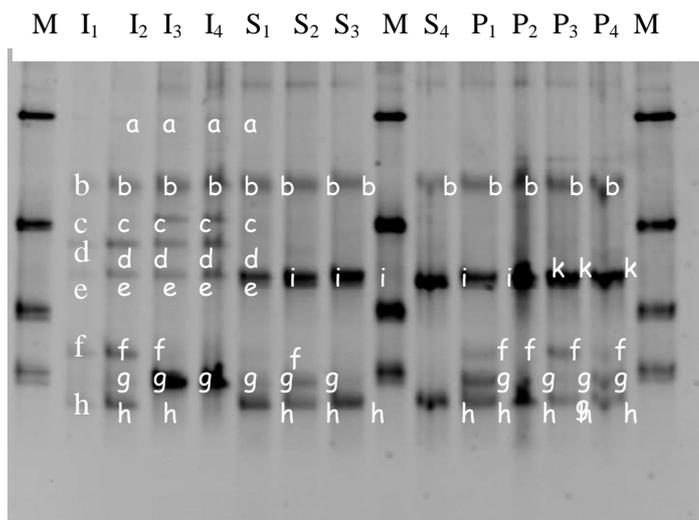


Figure 26 : Profils TTGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de laits fermentés de vache

a : *Lactococcus garvieae* ; **b** : *Leuconostoc citreum* ; **c** : *Staphylococcus epidermis/cohnii/equarum* ; **d** : *Lactobacillus brevis/jonhsoni*, *Staphylococcus haemolyticus/xylosus* ; **e,i, k**: *Lactobacillus acidophilus*; **f** : *Staphylococcus auricularis*; **g** : *Lactococcus lactis*; **h** : *Streptococcus thermophilus*.

Les profils des PCR-TTGE révèlent une grande diversité des espèces bactériennes présentes dans les produits laitiers fermentés traditionnels sénégalais. Du point de vue des espèces, *Leuconostoc citreum* (bande b), *Lactococcus lactis* (bande g), *Streptococcus thermophilus* (bande h) et *Lactobacillus delbrueckii/bulgaricus* (bandes k et i) restent les principales espèces de bactéries lactiques présentes dans tous les échantillons. D'autres bactéries lactiques d'intérêt avéré notamment *Lactobacillus brevis/jonhsoni* (bande d), *Lactobacillus acidophilus* (bande e) ont été retrouvées dans les laits fermentés étudiés.

Des espèces de staphylocoques à coagulase négatives (*S.epidermis/cohnii/equarum*, *S.haemolyticus* et *S.saprophyticus*) ont été également identifiées.

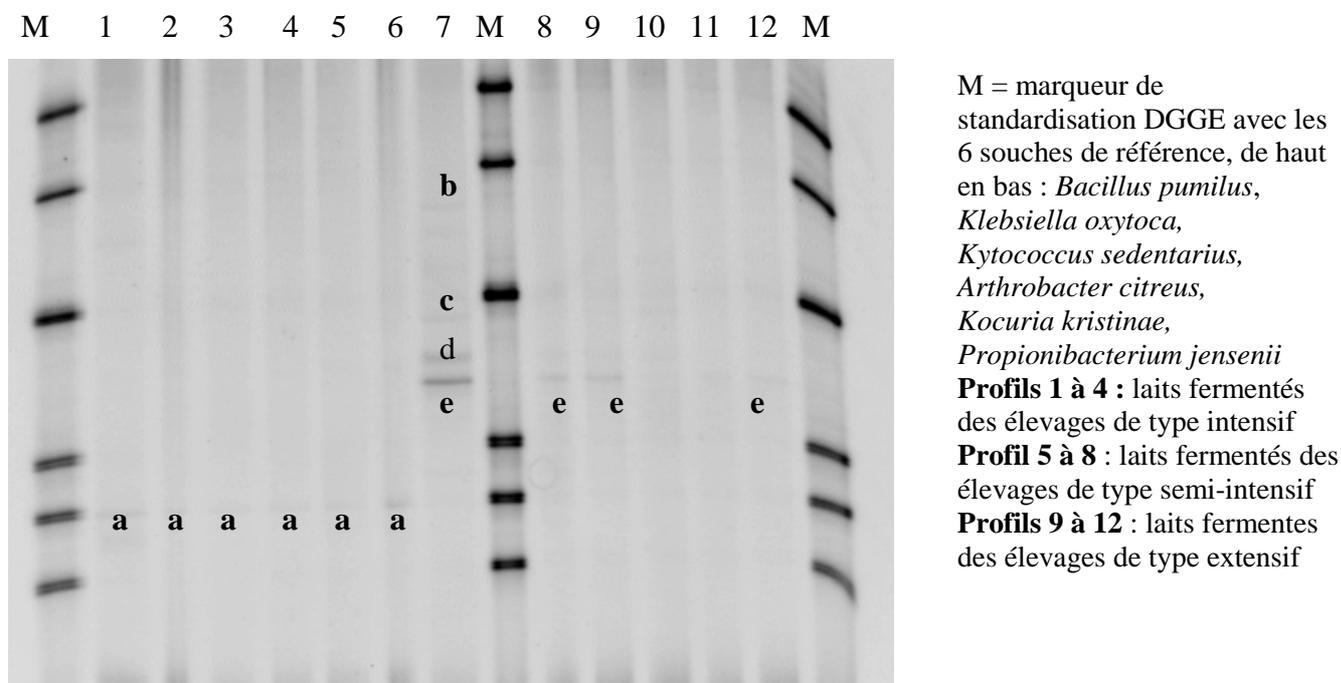


Figure 27 : Profils DGGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des échantillons de laits fermentés de vache

a : *Kocuria kristinae* ; **b** : *Brevibacterium linens* ;
c : *Clostridium fermentans/Corynebacterium amoniogenes* ;
d : *Arthrobacter* groupe I ; **e** : *Brevibacterium* sp.

Sur les gels de PCR-DGGE des laits fermentés (figure 29), les corynéformes tels que *Kocuria kristinae* (bande a) ont été retrouvés dans 5 échantillons dont quatre provenant des élevages intensifs. Dans les élevages de type extensif, c'est plutôt *Brevibacterium* sp. qui a été mis en évidence. Un échantillon des élevages semi-intensifs contenait à la fois *Brevibacterium linens*, *Clostridium fermentans/Corynebacterium* et *Arthrobacter* groupe I.

1.3. Microflore des laits crus et des fromages de chèvre

Les profils électrophorétiques des amplicons provenant des fragments de la région V3 de l'ADNr 16S de 12 échantillons (5 laits de fabrication et 7 fromages) obtenus par TTGE et DGGE sont présentés respectivement dans les figures 28 et 29.

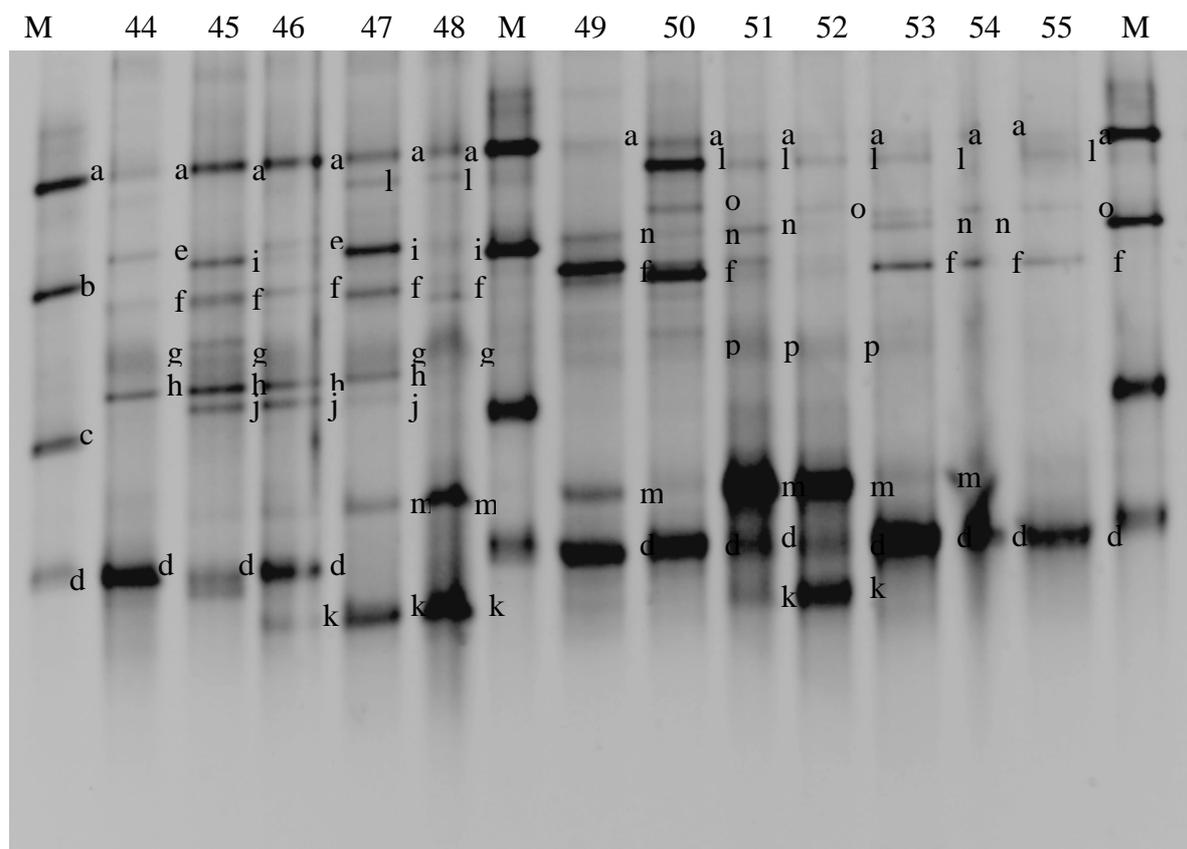


Figure 28 : Profils TTGE des amplicons V3 de l'ADNr 16S des échantillons de laits crus et fromages de chèvre

Le profil M est un marqueur de standardisation TTGE contenant quatre souches de référence (a: *Lactococcus garvieae* CNRZ1323, b : *Lactococcus raffinolactis* CNRZ1214, c : *Enterococcus faecalis* CE17, d: *Lactococcus lactis* subps *lactis* biov. *diacetylactis* CNRZ1260). Les profils 44 à 48 correspondent aux échantillons de lait cru et les profils 49 à 55 aux échantillons de fromage. e : *Listeria innoculata*, f : *Enterococcus* sp. g : *Pseudomonas putida*/*Aeromonas sobria*, h: *Staphylococcus saprophyticus*, i : *Leuconostoc mesenteroides*/*Staphylococcus simulans*, j : *Pediococcus pentosaceus*/*Streptococcus caseolyticus*, k : inconnu, l : *Lactobacillus gasseri/johnsonnii* m : *Staphylococcus auricularis*, n : *Staphylococcus aureus/epidermicus/cohnii*, o : *Lactobacillus delbrueckii/Lb.acidophilus* subsp *bulgaricus*, p : *Lactobacillus acidophilus*

Le profil TTGE montre que les échantillons de laits crus et fromages de chèvres étaient riches en bactéries bas GC % (< 55). Pas moins de 6 à 8 espèces bactériennes ont été identifiées dans chacun des échantillons. *Lactococcus garvieae* (bande a), *Enterococcus* spp. (bande f) et *Lactococcus lactis* (bande h) sont les trois espèces appartenant au groupe des bactéries lactiques qui sont quasiment présentes dans tous les échantillons. Sur le plan quantitatif, par l'intensité de sa bande (d), *Lactococcus lactis* apparaît comme l'espèce dominante aussi bien dans les laits de fabrication que dans les fromages. D'autres bactéries lactiques assignées à *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus caseolyticus* (bande j), *Lactobacillus gasseri/johnsonii* (bande l), *Leuconostoc mesenteroides* (bande i) et *Lactobacillus acidophilus* (bandes o et p) ont été également identifiées. Une empreinte qui n'avait pas été identifiée à partir de la base des données (bande k) a été assignée à *Streptococcus thermophilus* après séquençage.

Une flore bactérienne technologique non lactique appartenant au groupe des staphylocoques à coagulase négative (*Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus epidermis*), a également été mise en évidence aussi bien dans les laits de fabrication que dans les fromages. Enfin, les outils moléculaires utilisés ont permis d'identifier des espèces bactériennes telles *Listeria innoculata*, *Pseudomonas putida* et *Staphylococcus aureus* pouvant témoigner de la qualité sanitaire de nos échantillons.

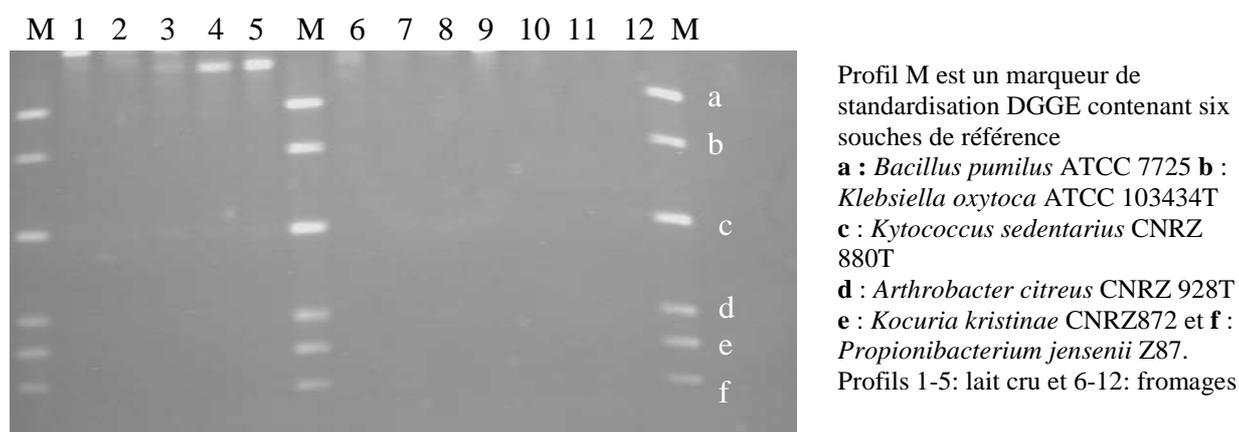


Figure 29 : Profils DGGE des amplicons V3 de l'ADNr 16S des échantillons analysés

Les laits fermentés étudiés ne contenaient pas d'espèce haut GC % comme le montre la photographie de gel DGGE (figure 29).

1.4. Détermination des espèces minoritaires par des PCR spécifiques d'espèces

Les espèces indicatrices de l'hygiène des procédés (*E. coli*) et de la sécurité des produits (*Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) ont été recherchées par l'utilisation d'amorces spécifiques à chaque espèce.

La présence d'*E. coli* a été confirmée dans tous les échantillons où ce germe avait été mis en évidence par les dénombrements bactériens (méthodes de microbiologie classique) comme le montrent les figures 30 et 31.

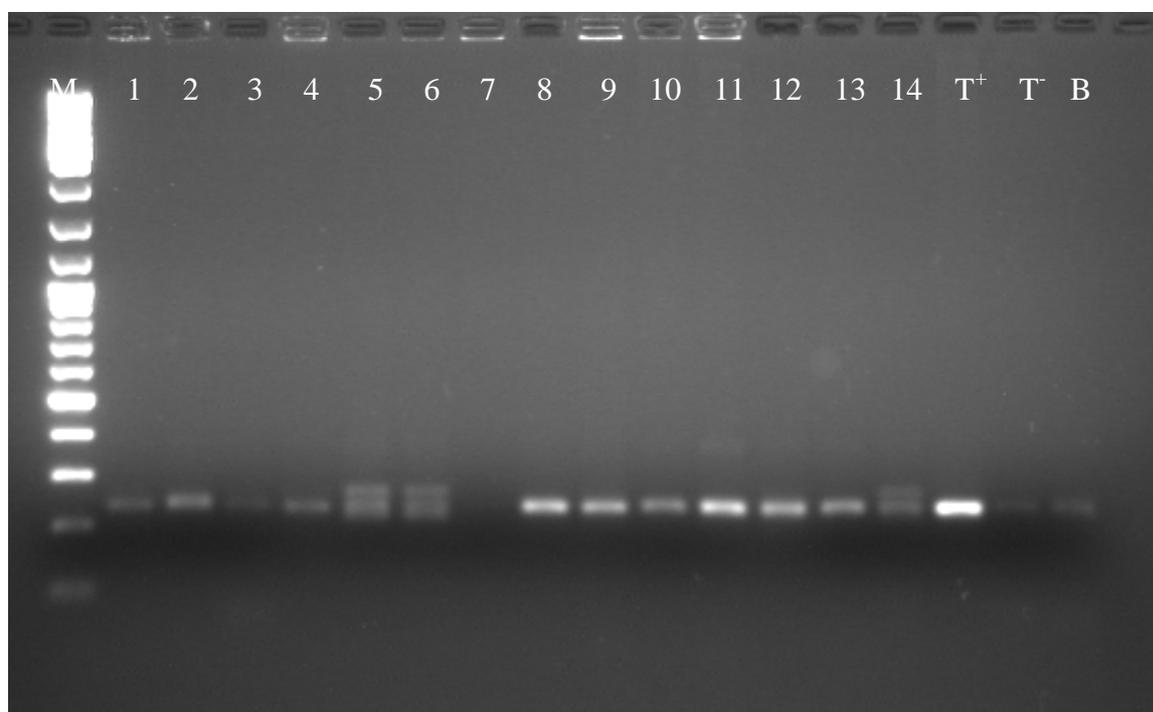


Figure 30 : Révélation sur gel d'agarose à 2 % des produits d'amplification par PCR d'extraits d'ADNr présumés *E. coli*

M : marqueur de standardisation de poids moléculaire connu (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) ; échantillons 1 à 4 : laits crus de vache issus des élevages intensifs, 5 à 8 : laits crus de vache issus des élevages semi-intensifs ; 9 à 12 : laits crus de vache issus des élevages extensifs ; 13 à 14 : laits crus de chèvre

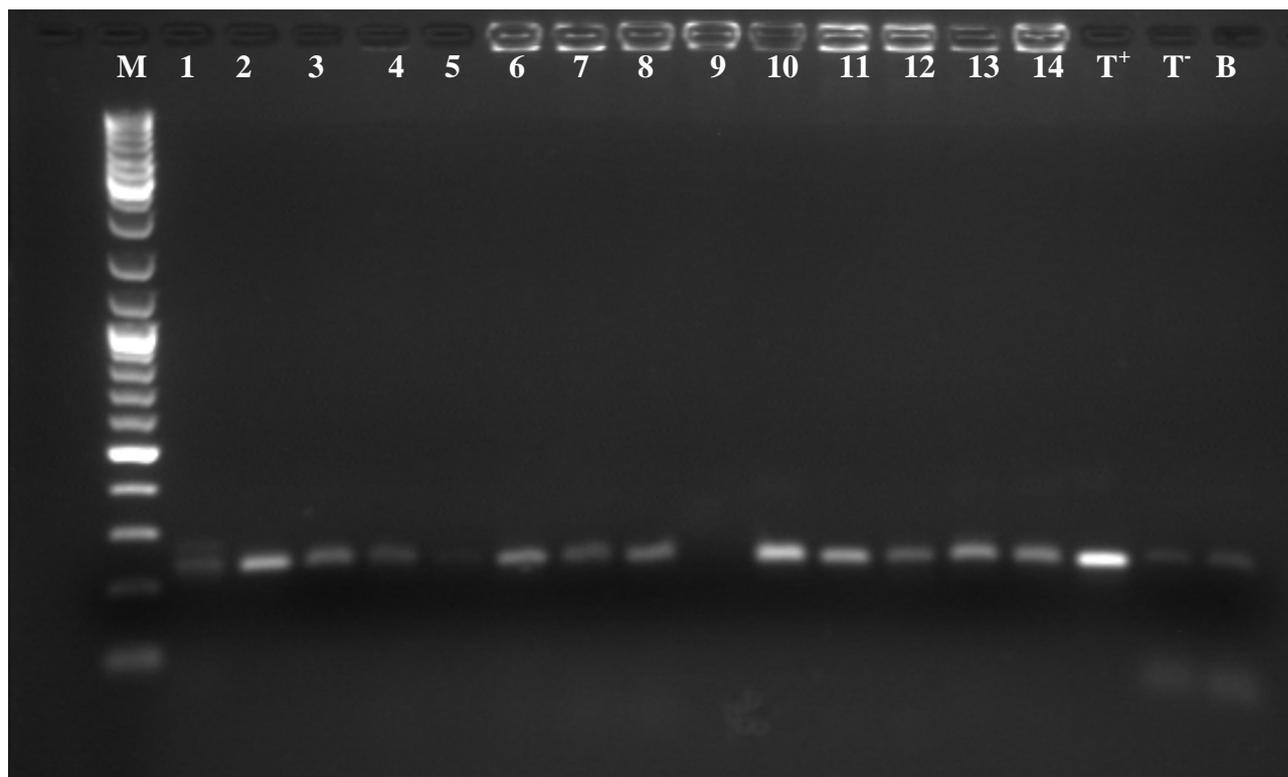


Figure 31 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplification par PCR d'extraits d'ADNr présumés *E.coli*

M : marqueur de standardisation de poids moléculaire connu (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) ; échantillons 1 à 4 : laits fermentés de vache issus des élevages intensifs, 5 à 8 : laits fermentés de vache issus des élevages semi-intensifs ; 9 à 12 : laits fermentés issus des élevages extensifs ; 13 à 14 : fromages de chèvre

Les tests de PCR spécifiques pour *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* ont été négatifs.

2. Discussion

Les outils de biologie moléculaire ont confirmé la richesse et la diversité bactérienne des échantillons de laits et produits laitiers analysés. Les profils TTGE des laits crus de chèvre et de vache de même que ceux des produits de fermentation qui y sont issus comprennent des espèces bactériennes nombreuses et variées.

Les échantillons de laits crus de vache avaient entre 4 et 7 bandes, donc autant de souches ou espèces bactériennes différentes.

De par l'intensité des bandes et le nombre des bandes, les laits et leurs produits de fermentation provenant des élevages extensifs sont plus riches et ont une plus grande biodiversité en bactéries lactiques. L'utilisation des calebasses en bois dont toute la surface constitue autant de niches pour l'implantation des germes, donc à faire les biofilms (Zottola, 1994) expliquerait cette richesse en bactéries lactiques. L'existence de ces biofilms est facilitée par la capacité de certaines espèces rencontrées dans nos échantillons comme *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* à générer les biofilms (Licitra et al., 2007). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de travaux antérieurs qui ont démontré que l'application des mesures d'hygiène trop strictes réduisait l'apport de la microflore utile dans les laits (Michel et al., 2001 ; Callon et al., 2007 ; Tormo et al., 2011b).

L'utilisation des méthodes moléculaires a montré que trois espèces, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecium/hirae/durans* et *Lactococcus lactis* sont quasiment présentes dans tous les échantillons de lait cru de vache. Dans les laits fermentés de vache, 4 espèces ; *Leuconostoc citreum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus acidophilus* apparaissent comme les principaux acteurs de la fermentation, car présentes dans tous les échantillons analysés. Ces espèces sont sensiblement les mêmes que celles isolées dans les laits fermentés traditionnels africains (Obodai et Dodd, 2006 ; Abdelgadir et al., 1998 ; Beukes et al., 2001 ; Mathara et al., 2004 ; El-Baradei et al., 2008).

Ces bactéries lactiques dénombrées dans les laits fermentés incluent les deux bactéries spécifiques du yaourt, *Streptococcus thermophilus* (nouvelle appellation : *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) et *Lactobacillus delbrueckii* (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*). En plus de ces deux espèces de ferments dit thermophiles, les laits fermentés analysés contenaient également les espèces du groupe de levains mésophiles comme *Leuconostoc citreum* et *Lactococcus lactis* (Fleet, 1999 ; Parente et Cogan, 2004). De nos résultats, il ressort que les laits de vache fermentés étaient le fruit de ferments endogènes mésophiles et thermophiles.

Par ailleurs, des espèces du genre *Lactobacillus* ; *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* ; qui font partie du groupe de bactéries lactiques non-levain ou NSLAB pour *Non Starter Lactic Acid Bacteria* (Martley et Crow, 1993) étaient présentes dans les échantillons de lait fermentés. Ces dernières sont connues pour leur effets bénéfiques sur la santé en tant que probiotiques (Holzapfel et al., 1998 ; Marteau et Rambaud, 1998, Collado et al., 2007) ou par leur capacité à sécréter des bactériocines (Oozeer et al., 1994 ; Elotmani et al., 2002).

Les profils DGGE des laits crus et fermentés présentaient peu ou pas du tout de bandes. Quelques espèces corynéiformes comme *Kocuria kristinae*, *Corynebacterium casei*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium bovis* et *Klebsiella oxytoca* ont été retrouvées surtout dans les laits crus de vache. Les corynéiformes, grâce à leurs propriétés lipolytiques et protéolytiques, participent à l'aromatisation des produits laitiers fermentés (Irlinger et al., 1997 ; Irlinger et al., 2004 ; Hoppe-Seyler et al., 2004). D'autres corynéiformes sont capables de produire des bactériocines (Valdés-Stauber et al., 1997). Les bactériocines sont des substances protéiques ayant des propriétés anti-microbiennes (Flynn et al., 2002).

L'analyse TTGE des échantillons de lait de chèvre et des fromages fabriqués à partir de ces laits a montré une large biodiversité. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc mesenteroides* sont les quatre espèces quasiment présentes dans les échantillons aussi bien de lait que de fromage. Sur le plan quantitatif, de part l'intensité de sa bande, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biov. *diacetylactis* (bande d) apparaît l'espèce dominante aussi bien dans les laits de fabrication que dans les fromages.

Les espèces de bactéries lactiques présentes dans les échantillons de fromages sont différentes de celles trouvées dans les mêmes types de fromages. Ainsi, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactobacillus plantarum* étaient les trois espèces les plus fréquemment rencontrées dans le Camembert, (Desmaures, 1995 ; Henri-Dubernet et al., 2004). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus garviae* et *Enterococcus faecalis* étaient des espèces dominantes des fromages traditionnels italiens au lait cru de chèvre (Colombo et al., 2010).

Dans le Bukuljac, fromages traditionnel de Serbie **Nikolic et al., (2008)** avaient également mis en évidence la prédominance de *Lactobacillus paracasei* et *Leuconostoc mesenteroides* alors que dans les fromages à pâte molle marocains, *Lactococcus garvieae* et *Leuconostoc mesenteroides* constituaient la majorité des isolats (**Ouadghiri et al., 2005**).

Dans les échantillons de laits et fromages de chèvre analysés dans cette étude, coexistaient également les espèces mésophiles (*Lactococcus*, *Leuconostoc*) et thermophiles (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* sp. à 45°C (**Fleet, 1999 ; Parente et Cogan, 2004**)). Par ailleurs, les bactéries lactiques non-levains ou NSLAB pour *Non Starter Lactic Acid Bacteria*, comme *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus johnsonii* et *Lb. acidophilus* ont été identifiées.

Il a été également observé dans nos échantillons la présence des espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Enterococcus* comme *Enterococcus hirae*, *Ent. faecium* et *Ent. durans*. Pour certains auteurs, la présence d'entérocoques serait un indice de conditions hygiéniques insuffisantes (**Dellaglio et al., 1994**). Sur le plan technologique, les entérocoques jouent un rôle dans l'affinage des fromages par la production d'estérases et de protéases, enzymes qui participent à la dégradation de la caséine et à la formation de certains composés d'arôme (**Wessels et al., 1990 ; Giraffa, 2003 ; Morales et al., 2004 ; Ogier et Serror, 2008**). Cependant, leur utilisation dans les levains suscite un débat du fait de leur implication dans de nombreuses infections nosocomiales ou opportunistes (**Franz et al., 1999 ; Ogier et Serror, 2008 ; Martín-Platero et al., 2009**).

Dans certains échantillons de laits de vache et de chèvre ainsi que dans leurs produits de fermentation (lait fermenté de vache et fromage de chèvre), des espèces de staphylocoques à coagulase négative (*Staphylococcus epidermis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* et *St. auricularis*) ont été mises en évidence. Ces espèces sont non pathogènes car ne produisant ni de coagulase libre ni d'entérotoxines (**Baird-Parker, 1990 ; Freney et al., 1999**). Ces germes qui pouvaient être d'origine mammaire et plus précisément du trayon, ces espèces ont des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui leur permettent de participer à la formation de la morge des fromages (**Curtin et al., 2002**) et à l'aromatisation des produits laitiers fermentés (**Irlinger et al., 1997**).

Les profils DGGE des laits et fromages de chèvre sont relativement simples car peu de corynéiformes ont été mis en évidence. La non observation de ces espèces s'expliquerait par un biais qui a été introduit lors de la prise d'essai, celle-ci ayant été effectuée dans la masse, les corynéiformes ne pouvaient pas être présentes car ce sont des bactéries aérobies strictes et sont donc plutôt présentes à la surface qu'à cœur des fromages (**Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995 ; Feurer *et al.*, 2004 ; Irlinger *et al.*, 2004**).

3. Conclusion partielle

L'analyse des échantillons de laits de vache et de chèvre ainsi que de leurs produits issus d'une fermentation spontanée a mis en évidence la diversité et la richesse de ces produits en bactéries lactiques. Pour tous les échantillons, les profils TTGE comprenaient 5 bandes pour les échantillons les moins riches et jusqu'à 10 bandes pour les plus complexes. Plusieurs espèces d'intérêt laitier avéré ont été mises en évidence : *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii/bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus caseolyticus*. D'autres espèces de bactéries lactiques dont le rôle dans la fermentation n'a pas été beaucoup étudié comme *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus plantaru*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis/jonhsoni*, *Lactobacillus gasseri/johnsonii* étaient présentes dans les échantillons analysés.

Enfin, d'autres espèces non lactiques mais d'intérêt technologique dans ce sens qu'elles interviennent dans la définition des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers fermentés ont été également identifiées dans les échantillons analysés. Il s'agit des staphylocoques à coagulase négative (*Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus saprophyticus*) mais aussi des bactéries corynéiformes (*Klebsiella oxytoca*, *Kocuria kristinae*, *Corynebacterium casei*, *Brevibacterium linens* et *Brevibacterium bovis*).

Cette biodiversité des écosystèmes bactériens des produits laitiers fermentés serait à l'origine des caractéristiques organoleptiques bien particulières des produits laitiers fermentés fermiers sénégalais.

Il est en effet actuellement reconnu que les produits laitiers fermentés au lait cru ont des saveurs plus marquées et plus typiques que ceux fabriqués au lait pasteurisé et microfiltré.

IV. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES LAITS ET FROMAGES ETUDIÉS

1. Résultats

La caractérisation physico-chimique des laits et fromages analysés a concerné : la mesure de l'acidité titrable, le dosage des constituants majeurs que sont la matière grasse et les protéines totales dans tous les échantillons, la teneur en eau et en chlorure de sodium dans les fromages uniquement.

1.1. Acidité titrable

L'acidité titrable ou acidité Dornic mesure l'acidité développée après la traite, c'est-à-dire la quantité d'acide lactique formée à partir du lactose, sous l'action des bactéries lactiques responsables de la fermentation. Les valeurs moyennes de l'acidité titrable exprimées en degré Dornic des échantillons de laits fermentés des exploitations appartenant aux systèmes intensif, semi-intensif et extensif sont respectivement de 67,0, 73,7 et 108,0°D. Les laits les plus acides sont ceux issus des exploitations de type extensif comme le montre la figure 32.

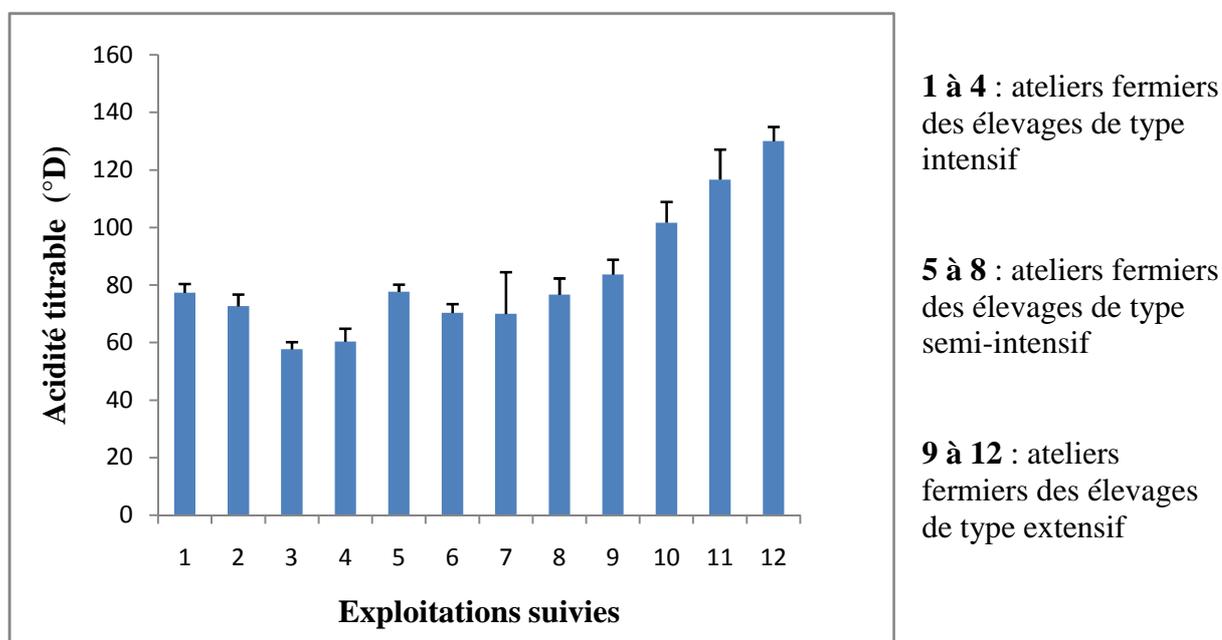


Figure 32 : Acidité moyenne des échantillons de laits fermentés produits dans les douze exploitations fermières suivies

1.2. Teneur en matière grasse et protéines totales des laits frais et fermentés de vache

Les teneurs en matière grasse et en protéines totales dans les laits crus et fermentés de vache provenant des trois systèmes de production sont mentionnées dans les tableaux XXI et XXII. Dans les laits fermentés, les teneurs moyennes en protéines et en matière grasse augmentent légèrement par rapport au lait frais pour atteindre respectivement 39 g/L et 43 g/L.

Tableau XXI : Teneur moyenne en matières utiles dans les laits crus de vache

	Système intensif	Système semi-intensif	Système extensif
Protéines (g/L)	35,05 ^a ±0,44	35,08 ^a ±0,33	36,44 ^a ±1,01
Matière grasse (g/L)	34 ^a ±0,81	42 ^b ±1,6	39 ^c ±1,15

Les moyennes d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %

Tableau XXII : Teneur moyenne en matières utiles dans les laits fermentés de vache

	Système intensif	Système semi-intensif	Système extensif
Protéines (g/L)	38,3 ^a ±0,2	38,2 ^a ±0,8	39,43 ^a ±1,01
Matière grasse (g/L)	39,25 ^a ±0,5	42,25 ^b ±0,5	43 ^b ±0,81

Les moyennes d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %

1.3. Teneur en protéines totales et en matière grasse des laits frais et fromages de chèvre

Les résultats des analyses physico-chimiques pour les laits et fromages de chèvre sont présentés dans le tableau XXIII. Les teneurs en protéines totales sont exprimées en g/100 mL pour le lait et en g/100 g pour le fromage. Celles de la matière grasse sont exprimées en g/100 mL de lait et en g/100 g de fromage.

Pour les deux fromageries, l'examen des résultats de la composition des laits de chèvre en protéines totales et en matière grasse a donné respectivement des valeurs moyennes de 4,21 et 5,16 g/100 mL de lait. Pour la fromagerie A, la teneur moyenne en protéines totales a été évaluée à 19,20 g/100 g de fromage, celle de la matière grasse à 11,25 g/100 g de fromage.

Pour la fromagerie B, la teneur moyenne en protéines est de 12,96 g/100 g de fromages et celle de la matière grasse de 19,40 g/100 g de fromage.

Tableau XXIII : Teneurs en protéines totales et en matière grasse dans les laits et fromages de chèvre

Paramètres	Fromagerie A		Fromagerie B	
	Lait de fabrication	Fromage	Lait de fabrication	Fromage
Protéines totales (g/100 mL ou g/100 g)	4,24±0,08	19,20±0,34	4,19±0,05	12,96±0,15
Matières grasses (g/100 mL ou g/100g)	5,21±0,25	11,25±0,5	5,11±0,25	19,40±0,3

1.4. Teneur en chlorure de sodium et en eau dans les fromages

Le dosage de la teneur en sel dans les fromages a donné les valeurs moyennes de 1,84 g/100 g et 0,98 g/100g de fromage respectivement pour les fromageries A et B. Une variation de la teneur en de chlorure de sodium a été observée entre les différents lots de fabrication des deux fromageries (tableau XXIV).

Tableau XXIV : Teneurs en chlorure de sodium dans les fromages étudiés

	Fromagerie A				Fromagerie B			
	1 ^{er} lot	2 ^{ème} lot	3 ^{ème} lot	4 ^{ème} lot	1 ^{er} lot	2 ^{ème} lot	3 ^{ème} lot	4 ^{ème} lot
NaCl (%)	2,82	1,73	1,45	1,36	1,54	0,77	0,81	0,79
Moyenne	1,84±0,67				0,98±0,38			

La teneur en eau dans les fromages a été évaluée à 57,7 % pour les échantillons de la fromagerie A et 65,4 % pour ceux de la fromagerie B.

2. Discussion

Après 24 heures de fermentation « spontanée » à température ambiante, une grande variation de l'acidité a été observée entre les laits fermentés issus des trois systèmes d'élevage. Les laits issus des exploitations de type extensif étaient plus acides que ceux des exploitations de type semi-intensif, eux-mêmes plus acides que ceux provenant des exploitations de type intensif. Cette variation dans les niveaux d'acidification pourrait s'expliquer en partie par l'absence de contrôle de température au cours de la fermentation. La fermentation est en effet totalement tributaire de la température ambiante du lieu et du moment. Pendant la période d'étude (janvier-mars 2008), les températures moyennes étaient respectivement de 28°C, 35°C et 40°C respectivement en zone intensive, semi-intensive et extensive (données fournies par le service de météorologie du Sénégal). Dans un même système, une variation du niveau d'acidification était également observée entre les échantillons des différentes exploitations et dans une même exploitation entre les différents lots production. Ce constat corrobore nos observations précédentes qui signalaient un manque de standardisation des procédés de fermentation. Enfin, des niveaux d'acidification faibles (de l'ordre de 60°D) ont été observés pour les laits provenant des exploitations de type intensif. Cette faible acidification pourrait favoriser la prolifération de microorganismes dans le lait comme l'ont déjà souligné **Casalta et al (1996)**. En effet, ces auteurs ont montré qu'en cas d'acidification insuffisante, le caillé peut être le siège d'un développement des bactéries d'altération et même potentiellement des bactéries pathogènes (**Casalta et al., 1996**).

Les teneurs en protéines et en matière grasse assurent la valeur alimentaire du lait et ses usages en transformation laitière. De façon générale, les laits de vache analysés avaient une bonne teneur en matière utile. Les teneurs en protéines totales et en matière grasse dans les échantillons de lait frais de vache étaient respectivement de 35,4 g/L et 38 g/L. Ces teneurs sont légèrement supérieures aux valeurs généralement admises dans le lait de vache, soit respectivement 32 g/L pour les protéines et 37 g/L pour la matière grasse (**Amiot et al., 2002**). Les valeurs obtenues dans cette étude sont cependant inférieures à celles des laits frais issus des troupeaux soudanais pour lesquels la teneur en protéines était de 37,3 g/L et celle de la matière grasse de 45,2 g/L (**Mahboba et al., 2007**).

Elles étaient toutefois supérieures à celles des troupeaux marocains, respectivement de 31,7 et 37,5 g/L pour les protéines et la matière grasse (**Anonyme 6, 2006**). Les teneurs en matière grasse et en protéines totales variaient d'un système d'exploitation à un autre. Des ces deux paramètres, le taux butyreux était le plus variable $p = 0,005$ pour la matière grasse contre $p = 0,035$ pour les protéines. Les taux les plus élevés ont été observés pour les laits prélevés dans les exploitations de type semi-intensif et les plus faibles dans les laits des exploitations de type intensif. Ces différences s'expliquent d'une part par un régime alimentaire basé sur l'utilisation des tourteaux d'arachide provenant des huileries traditionnelles dans les exploitations du type semi-intensif, et d'autre part par le niveau de productivité plus important dans le système intensif (16L de lait/vache/jour) que dans le système semi-intensif (2,5 L de lait/vache/jour). Ces liens entre la qualité chimique du lait et les pratiques d'élevage avaient été observés auparavant (**Goldberg et al., 1992 ; Sraïri et al., 2009**).

Dans le lait de chèvre, la teneur en matière grasse atteignait respectivement 5,21 g/L pour la fromagerie A et 5,11 g/L pour la fromagerie B. Ces valeurs étaient proches entre les deux fromageries mais supérieures à la valeur moyenne généralement admise qui est de 35-40 g/L (**Anonyme 7, 2007**). Nos valeurs étaient supérieures à celles des laits issus des troupeaux français lesquels contenaient en moyenne 35 g/L de matière grasse à la traite (**Masle et Morgan, 2001**). **Casalta et al. (2001)** pour leur part, lors de la caractérisation du fromage *Bastelicaccia*, avaient trouvé que les laits de chèvre qui servaient à la fabrication de ce fromage contenaient 47,06 g de matière grasse par litre de lait. Pour **Mukulec et al. (2008)**, la matière grasse dans les laits de chèvre de Croatie atteignait 59,6 g/L.

De par leur teneurs en protéines, les fromages provenant de la fromagerie A (19,20 %) étaient proches du fromage *Feta* lequel contient 17,8 % de protéines (**Vassiliadis et al., 2009**). Les fromages B (12,96 % de protéines) sont plutôt proches des fromages frais, soit 11,8 % (**Codex Alimentarius, 1978**). Cependant, pour la fromagerie A, une bonne partie de protéines solubles était éliminée avec le lactosérum lors de l'égouttage du caillé. Le dosage de la teneur en protéines dans le lactosérum a donné 11,16 % de protéines contre 19,6 % dans les fromages. L'ultrafiltration de lactosérum pourrait permettre de récupérer les protéines dans le rétentat.

Ce dernier pourrait être incorporé dans les laits de fabrication pour améliorer le rendement fromager et diminuer la pollution de l'environnement car le lactosérum était rejeté dans la nature sans traitement préalable.

La teneur en chlorure de sodium (NaCl) des échantillons analysés indiquait également une grande variabilité entre les différents lots de fabrication. Ce qui témoignait d'un manque de standardisation du processus. Dans la fromagerie A, 75 % des fromages avaient une teneur en NaCl comprise entre 1,3 et 1,75 % tandis que 25 % avaient une teneur supérieure à 2,8 %. Ces valeurs sont inférieures à celles des autres fromages saumurés comme le *Feta* (4 % de NaCl) (Vassiliadis *et al.*, 2009) ou le *Domiat*, fromage égyptien dont la teneur en chlorure de sodium atteignait 6 % (El-Baradei *et al.*, 2007). Le fromage *Bastelicaccia* contenait 2,08 % de NaCl (Casalta *et al.*, 2001) alors que le fromage traditionnel de Croatie en contenait entre 2,52 et 2,1 % (Mukulec *et al.*, 2008).

Les différences observées entre les échantillons des différents lots de production, seraient dues au manque de maîtrise des facteurs qui conditionnent la quantité de sel absorbée comme le temps de salage et la concentration de sel dans la saumure. Ce qui témoigne encore une fois du manque de standardisation du processus.

3. Conclusion partielle

Les analyses physico-chimiques qui ont porté sur l'acidité titrable, les teneurs en protéines, en matière grasse et en chlorure de sodium des échantillons de lait (cru et fermenté) et de fromage ont montré que ces paramètres variaient d'un système à un autre et d'une fromagerie à une autre. L'acidité titrable des laits fermentés était en moyenne de 83°D, avec une variation de plus de 70°D lorsqu'on passait des échantillons du système intensif à ceux du système extensif.

Des données obtenues, il ressort que dans les conditions locales de production, les laits issus des exploitations de type extensif suivis de ceux de type semi-intensif étaient plus riches en protéines totales.

Le taux le plus élevé en matière grasse a été observé pour les laits provenant des exploitations de type agro-pastoral avec 42 g/L, alors que la valeur la plus faible a été notée pour les laits issus des exploitations de type intensif. Ces différences pourraient s'expliquer par les races de vaches exploitées et par les régimes alimentaires auxquels elles sont soumises.

La grande variation de la productivité des vaches, en moyenne 3 L de lait/vache/jour dans le système semi-intensif, contre 16 L de lait/vache/jour pour le système intensif expliquerait en partie la valeur de la teneur en matière grasse rapportée au litre de lait produit. L'utilisation de la graine de coton et des tourteaux d'arachide issus des huileries traditionnelles serait aussi un élément de réponse pour expliquer les teneurs élevées en matière grasse dans les laits issus des élevages semi-intensifs.

Des résultats obtenus, il ressort également que le lait de chèvre avait de meilleures aptitudes fromagères et nutritionnelles que le lait de vache (en moyenne 42,2 g/L contre 36 g/L pour les protéines et 51,6 g/L contre 38 g/L pour la matière grasse totale). Les fromages analysés contenaient 19,2 % de protéines et 19,4 % de matière grasse (fromagerie A), 12,96 % de protéines et 11,25 % de matière grasse (fromagerie B).

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

I. CONCLUSION GENERALE

Au Sénégal, le lait fermenté de vache appelé communément “lait caillé” fait parti des aliments de base. Il est très populaire en raison de son goût agréable mais aussi grâce à l’élargissement de l’offre par l’ajout d’autres aliments, tels que les céréales. En 2008, la quasi-totalité des 120 millions de litres de lait dont 19,4 millions de litres de lait de chèvre produits localement ont été transformés en lait fermentés et ce, dans des exploitations fermières et ateliers artisanaux. Le but de ce travail de recherche était de décrire les paramètres de production et les caractéristiques analytiques (physico-chimiques et microbiologiques) des laits et produits laitiers fermentés fermiers produits au Sénégal.

Les enquêtes de suivi dans les exploitations bovines ont révélé des pratiques différenciées en termes de races exploitées, de conduite du troupeau et de modalités de traite. Cinq catégories d’élevage ayant des pratiques plus au moins homogènes ont pu être constituées. La première catégorie comprenait des élevages hautement intensifs, 16 L/vache/jour et qui pratiquaient une traite mécanique propre. Les élevages de la deuxième catégorie avaient un niveau d’intensification moyen, 12 L/vache/jour en moyenne et une traite manuelle propre. La troisième catégorie regroupait des exploitations à intensification faible, 4 L/vache/jour et qui s’illustraient par une traite manuelle assez propre. La quatrième catégorie regroupait les exploitations extensives, en moyenne de 2 L/vache/jour et qui pratiquaient une traite manuelle sale. Enfin, la dernière catégorie représentait des élevages hautement extensifs, à peine 1 L/vache/jour et ayant une traite manuelle très sale.

Pour la production des fromages de chèvre, l’offre en lait de fabrication dans la fromagerie A était très atomisée. Cette fromagerie s’approvisionnait auprès de 15 petites exploitations caprines, en moyenne 15 chèvres par exploitation avec une productivité d’à peine 0,5L/chèvre/jour. Ces chèvreries pratiquaient une traite manuelle sale. A l’opposé, la fromagerie B disposait de sa propre chèvrerie constituée de chèvres de races locale et importée. La conduite du troupeau était mixte et la production laitière était en moyenne de 1 L/chèvre/jour. En ce qui concerne les procédés de transformation du lait, en dehors de la vaisselle laitière, les diagrammes de fabrication étaient simples et proches. La fermentation se faisait sur l’exploitation, sans ajout de levains industriels (sauf pour la fromagerie A).

Aussi bien pour la fabrication des laits fermentés de vache que pour celle des fromages de chèvres, les conditions technologiques de fabrication n'étaient pas contrôlées et pouvaient varier d'une fabrication à une autre.

Ce manque de standardisation des procédés auquel s'ajoutent les pratiques différentes en termes de races exploitées et de conduite des animaux avaient une incidence sur la teneur du lait en constituants majeurs, notamment la matière grasse pour laquelle une variation significative, au seuil de 5 % a été observée, aussi bien dans les laits crus que dans les laits fermentés. Le taux butyreux le plus élevé a été observé dans les laits provenant des exploitations de type agro-pastoral avec 42 g/L, alors que la valeur la plus faible a été obtenue dans laits issus des exploitations de type intensif. Des données obtenues, il ressort également que dans les conditions locales de production, le lait de chèvre avait de meilleures aptitudes fromagères et nutritionnelles que le lait de vache, soit en moyenne 42,2 g/L contre 36 g/L pour les protéines et 51,6 g/L contre 38 g/L pour la matière grasse totale. Les fromages issus des laits de chèvre contenaient 19,2 % de protéines et 19,4% de matière grasse (fromagerie A), 12,96 % de protéines et 11,25 % de matière grasse (fromage B). Dans les laits fermentés, la teneur moyenne en protéines totales étaient de 38 g/L, celle de la matière grasse de 42 g/L.

Les numérations en microflores bactériennes indiquaient une variation significative de la flore lactique en fonction des types d'élevage. Les populations les plus nombreuses ont été observées dans les échantillons provenant des exploitations de type extensif. Dans tous les cas, tous les échantillons analysés étaient riches en flore lactique. Les dénombrements moyens des lactobacilles mésophiles, étaient de $2,86.10^5$ ufc/mL dans le lait cru de vache et de $1,37.10^7$ ufc/mL dans celui de chèvre. Dans les laits fermentés et dans les fromages, ils atteignaient respectivement $2,17.10^7$ ufc/mL de lait et $2,86.10^8$ ufc/g de fromage. La population des lactobacilles thermophiles était de $4,16.10^4$ ufc/mL dans le lait de vache, $2,50.10^5$ ufc/mL dans celui de chèvre, de $2,21.10^7$ ufc/g de fromage et de $7,12.10^7$ ufc/mL de lait fermenté. Les lactocoques étaient dénombrés à hauteur de $5,35.10^5$ ufc/mL dans le lait cru de vache, $1,14.10^8$ ufc/mL dans le lait de chèvre, $2,20.10^8$ ufc/mL dans le lait fermenté de vache et $1,84.10^8$ ufc/g de fromage de chèvre.

Les leuconostocs et les entérocoques étaient les moins représentés soit respectivement $2,35 \cdot 10^4$ ufc/mL de lait de chèvre et $7,62 \cdot 10^3$ ufc/mL de lait de vache. Dans les laits fermentés, les numérations moyennes en leuconostocs atteignaient $1,88 \cdot 10^7$ ufc/mL, celles d'entérocoques $1,30 \cdot 10^6$ ufc/mL. Dans les fromages, les leuconostocs ont été évalués à $4,20 \cdot 10^4$ ufc/g et les entérocoques à $5,74 \cdot 10^5$ ufc/g de fromage.

La richesse et la diversité des échantillons analysés ont été confirmées par les outils de biologie moléculaire. Plusieurs espèces de bactéries lactiques d'intérêt technologique avéré ont été mises en évidence : *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii/bulgaricus*, *Lactobacillus brevis/johnsoni*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus caseolyticus*. D'autres espèces de bactéries lactiques dont le rôle dans la fermentation n'a pas été encore bien étudié comme *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus gasserii/johnsonii* ont été identifiées dans les échantillons analysés. Enfin, des espèces non lactiques mais d'intérêt technologique comme les staphylocoques à coagulase négative (*Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus saprophyticus*) et les bactéries corynéiformes (*Klebsiella oxytoca*, *Kocuria kristinae*, *Corynebacterium casei*, *Brevibacterium linens* et *Brevibacterium bovis*) étaient également présentes dans les échantillons analysés. Dans tous les échantillons, les lactobacilles mésophiles et les lactocoques co-dominaient de même que les lactobacilles mésophiles et thermophiles co-existaient. Des espèces homofermentaires (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*) et hétérofermentaires (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*) ont été retrouvées. Ce qui indiquait la complexité des levains naturels des produits laitiers fermentés étudiés.

Du point de vue salubrité et sécurité des produits, des colonies d'*E.coli* et de Staphylocoques à coagulase positive ont été dénombrées dans certains échantillons, mais à des seuils relativement faibles. Aucun pathogène (*Salmonella sp.* ou *Listeria monocytogenes*) n'a été détecté dans un aucun échantillon de lait de vache. *Salmonella sp.* a été retrouvé dans un échantillon de lait de chèvre et *Listeria monocytogenes* dans un échantillon de fromage.

Cependant, les PCR spécifiques d'espèces n'ont confirmé ni la présence de *Listeria monocytogenes* ni celle de *Staphylococcus aureus*. En revanche, la majorité des échantillons testés ont été positifs à la PCR spécifique pour *E.coli*.

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus montrait que quelque soient les pratiques, les conditions locales d'élevage bovin et caprin permettaient d'obtenir des laits riches en matières utiles (protéines et matière grasse). Les laits de vache et de chèvre produits localement ont donc une bonne valeur alimentaire et de bonnes aptitudes fromagères. Ces mêmes laits et leurs produits de fermentation étaient riches en bactéries d'intérêt aussi bien laitier qu'agro-industriels. Si l'hygiène à la ferme est maîtrisée, ces productions fermières trouveront un écho favorable chez certains consommateurs, soucieux d'une alimentation saine et qui désirent participer au développement des filières locales. De plus, les potentialités d'utilisation de la microflore naturellement présente dans ces productions fermières dans la biopréservation et dans la fabrication d'aliments santé sont bien réelles.

II. PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude constituent les premiers travaux d'un programme de recherche qui devrait se poursuivre aussi bien en amont qu'en aval de la filière locale du lait au Sénégal :

- ✚ Le premier volet consisterait à faire une caractérisation plus poussée des rations alimentaires données aux vaches laitières (caractérisation floristique des pâturages naturels, des rations formulées) et voir leur impact sur la productivité et la composition du lait en ses différents constituants chimiques (acides gras, profil protéique et autres micro-nutriments) et microbiologiques ;

- ✚ Le deuxième volet à visée technologique, consisterait à choisir 2 à 3 souches de bactéries lactiques majoritairement présentes dans les laits fermentés produits localement pour tester leurs aptitudes technologiques en tant que levain (pouvoir acidifiant, production d'arôme, résistance au sucre, inhibition des germes pathogènes tels que *E.coli*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, capacité à produire des biofilms) ;

- ✚ Après avoir mis sur pied le levain, le troisième volet de ce travail de recherche consisterait à faire des essais de fermentation au laboratoire et en milieu réel sur du lait local pasteurisé pour l'obtention de lait fermenté et de fromage. Des analyses sensorielles de ces produits permettront enfin d'évaluer l'acceptabilité des laits fermentés obtenus auprès des consommateurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdelgadir W. S, Ahmad T. K., Dirar H. (1998).** The traditional fermented milk products of Sudan. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 1-13.
2. **Adams M. R., Marteau P. (1995).** On the safety of acid lactic bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* **27** :263-264.
3. **Adams M. R., Hall C. J. (1988).** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. & Technol.* **23**: 287-292.
4. **Addo K.K., Mensah G.I., Aning K.G., Nartey N., Nipah G.K., Bonsu C., Akyeh M.L., Smits H.L. (2011).** Microbiological quality and antibiotic residues in informally marketed raw cow milk within the coastal savannah zone of Ghana. *Trop Anim Health Prod.* **16**: 227-233
5. **Afif A., Faid M., Chigr F., Najimi M. (2008).** Survey of the microbiological quality of the raw cow milk in the Tadla area of Morocco. *Int. J. Food Sci. & Technol.* **61**: 340-346.
6. **Amann R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**: 143-169.
7. **Amann R., Ludwig W. (2000).** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *Microbiol Rev.* **24**: 555-565.
8. **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R., Turgeon H. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait, in Science et technologie du lait, pp.1-74. Vignola C.L., Ed., *Presses Internationales Polytechnique, Québec*
9. **Anema S.G. (2009).** Effect of milk solids concentration on the pH, soluble calcium and soluble phosphate levels of milk during heating. *Dairy Sci. Technol.* **89**: 501-510
10. **Anonyme 1 (2007).** Rapport annuel 2006. Sénégal/Ministère de l'élevage/Direction de l'élevage (Direl). 111p.
11. **Anonyme 2 (2009).** Rapport annuel 2008. Sénégal/Ministère de l'élevage/Direction de l'élevage (Direl). 85p.
12. **Anonyme 3 (2009).** Les bactéries lactiques. *Danone-World Newsletter n°30*. 6p.
13. **Anonyme 4. (2001).** Technique de biologie moléculaire. Institut National de Recherche pédagogique. Disponible sur [<http://www.inrp.fr/Acces/biotic/biomol/techgen/accuei>]. Consulté en novembre 2010
14. **Anonyme 5. (2009).** National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotids* (BLASTN). Disponible sur [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]. Consulté en décembre 2010

15. **Anonyme 6 (2006)**. Qualité globale du lait cru de vache au Maroc. Ministère de l'agriculture et du développement rural du Maroc. *Bulletin mensuel d'information et de liaison*, n° 137, 4p.
16. **Anonyme 7 (2007)**. Les qualités nutritionnelles du lait et des fromages de chèvre. *Institut Technique des Produits Laitiers Caprins*. France 9p.
17. **AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1996)**. Official Methods Analysis, 16^e Edition, Washington.
18. **Aponte M., Fusco V., Andolfi R., Coppola S. (2008)**. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *Int. Dairy J.* **18**: 403-413.
19. **Aquilanti L., Dell'Aquila L., Zannini E., Zocchetti A., Clementi F. (2006)**. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**: 161-167.
20. **Arrigoni E., Marteau P., Briet F., Pochart P., Rambaud J.C., Messing B. (1994)**. Tolerance and absorption of lactose from milk and yoghurt during short bowel syndrome in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**: 926-929.
21. **Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkanen H., Salminen S., Maunula L., Isolauri E. (1999)**. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics.* **104**: 1-4.
22. **Atlan D., Aubel D., Gilbert C. (2000)**. La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface. *Sciences des Aliments.* **20**: 5-17
23. **Axelsson L. (1998)**. Lactic acid bacteria: classification and physiology, *Marcel Dekker, Inc, New York*.
24. **Ayad E.H.E; Verheul A., de Jong C., Wouters J.T.M., Smith G. (1999)**. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int. Dairy J.* **9**: 725-735
25. **Baroiller C. et Schmidt J. L. (1990)**. Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Le Lait.* **70**: 67-84.
26. **Baird-Parker A. (1990)**. The Staphylococci: an introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Supp.* 1s-8s.
27. **Batdorj B., Trinetta V., Dalgalarrrondo M., Prévost H., Dousset X., Ivanova I., Haertlé T., Chobert J.M. (2007)**. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 584-593.

28. **Beausoleil E.J., Fortier G. S., L'ecuyer A., Savoie M., Franco M., Lachaine J., Weiss K. (2007).** Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can. J. Gastroenterol.* **21**: 732-736.
29. **Benkerroum N., Oubel H., Mimoun L. B. (2002).** Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *J. Food. Prot.* **65**: 799-805.
30. **Beresford T P., Fitzsimons N A., Brennan N L., Cogan T M. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* **11**: 259-274.
31. **Beukes E.M., Bester B.H., Mostert J.F (2001).** The microbiology of South African traditional fermented milks. *Int J. Food Microbiol.* **63**: 189-197.
32. **Bonaïti C., Parayre S., Irlinger F. (2006).** Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int J. Food Microbiol.* **107**: 171-179.
33. **Bonfoh B., Zinsstag J., Fara Z., Simbé C.F., Alfaroukh I O., Aebi R., Badertscher R., Collomb M., Meyes J., Rehberger B. (2005).** Raw milk composition of Malian Zebu cows (*Bos indicus*) raised under traditional system. *J. Food Compos. Analysis.* **18**: 29-38.
34. **Bouton Y., Tessier L., Guyot P., Beuvier E. (2005).** Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits du Comté. *Renc. Rech. Ruminants.* **12**: 403
35. **Breurec S., Poueme R., Fall C., Tall A., Diawara A., Bada-Alamedji R., Broutin C., Leclercq A., Garin B. (2010).** Microbiological quality of milk from small processing units in Senegal. *Foodborne Pathog Dis.* **7**: 601-604.
36. **Broutin C., Sokona K., Tandia A. (2000).** Paysage des entreprises et environnement de la filière lait au Sénégal, programme INCO "MPE agroalimentaires", Dakar, 57p. Disponible sur : www.gret.org/income/pdf/illaitn.pdf. Consulté en mai 2008
37. **Brulé G., Lenoir J., Remeuf F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait, in Le fromage, Eck K. et Gillis J.C. Ed., *Lavoisier, Tec. et doc.*, pp. 7-41.
38. **Callon C., Berdagué J.L., Dufour E., Montel M.C (2005).** The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. *J Dairy Sci.* **88**: 3840-3850.
39. **Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, Montel M.C. (2007).** Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**: 547-560.

40. **Caplice E, Fitzgerald G.F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 131-149.
41. **Casalta E., Casabianca F., de Sainte-Marie C. (1996).** Des souches microbiennes locales aux levains spécifiques : position des producteurs de fromages de Corse. *Cah. Agric.* **5**: 423-433.
42. **Casalta E., Noël Y., Le Bars D., Carré C., Achille C., Maroselli M.X. (2001).** Caractérisation du fromage Bastelicaccia. *Le Lait.* **81**: 529-546.
43. **Casalta, E. (2003).** Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru. Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques. Thèse à l'*Institut National de la Recherche Agronomique*. Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Élevage, Corté, France.
44. **Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J. C., Lamberet G., Lenoir J. (1997a).** La biochimie de l'affinage, in *Le fromage*, Ed. *Lavoisier. Tec. et Doc. Paris*, pp. 86-153.
45. **Choisy C., Desmazeaud M., Guéguen M., Lenoir J., Schmidt J. L., Tourneur C. (1997b).** Les phénomènes microbiens, in *Le fromage*, Ed. *Lavoisier. Tec. et Doc.*, pp. 377-446.
46. **Cibik R., Lepage E., Taillez P. (2000).** Molecular diversity of *Leuconostoc citreum* isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA amplification. *System. Microbiol.* **23**: 267-278.
47. **Clare D.A., Swaisgood E. (2000).** Bioactive milk peptides: a prospectus. *J. Dairy Sci.* **83**: 1187-1195.
48. **Commission du Codex Alimentarius. (1978).** Codex Stan A-6-1978 révisé en 2001. Norme générale pour le fromage.
49. **Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G. (2001).** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5113-5121.
50. **Coiffier O. (1992).** Les bactéries coliformes, in les groupes microbiens d'intérêt laitier, Hermier J., Lenoir J, Weber F, Ed. *CEPIL, Paris*, pp. 303-322.
51. **Collado M.C., Surono I.S. (2007).** Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization. *J. Food. Prot.* **70**: 700-705.
52. **Collins Y. F., McSweeney P. L., Wilkinson M. G. (2003).** Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in cheddar cheese during ripening. *J. Dairy Res.* **70**: 105-113.

-
53. **Colombo E., Franzetti L., Frusca M., Scarpellini M. (2010).** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Artisanal Italian goat cheese. *J Food Prot.* **73**: 657-662.
54. **Corsetti A., Rossi J., Gobbetti M. (2001).** Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 1-10.
55. **Coulon J.B., A. Delacroix-Buchet A., Martin B., Pirisi A. (2005).** Facteurs de production et qualité sensorielle des fromages. *INRA. Prod. Anim.* **18**: 49-62
56. **Curtin A.C., Gobbetti M., McSweeney P. L. (2002).** Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 231-240.
57. **Daviau C., Famelart M.H., Pierre A., Goudedranche H., Maubois J.L. (2000).** Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait.* **80**: 397-415.
58. **De Buyser M.B., Audinet M., Delbart M., Maire F. (1998).** Comparison of selective culture media to enumerate coagulase positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiol.* **15**: 339-346.
59. **De Buyser M. B., Dufour M., Lafarge V. (2001).** Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 1-17.
60. **Delbes C., Leila A M, Montel M.C. (2007).** Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and independent 16S rRNA gene-based analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1882-1891.
61. **Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M., Janssens D. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques, in Bactéries Lactiques I., De Roissart et Luquet, Ed. *Lorica, France.* pp. 25-116.
62. **Demarigny Y., Beuvier E., Buchin S., Pochet S., Grappin R. (1997).** Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses: Biochemical and sensory characteristics. *Le Lait.* **77**: 151-167.
63. **Denis P., Edwards E. A., Liss S. N., Fulthorpe R. (2003).** Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 769-778.
64. **Desmaures, N. (1995).** Etude des laits de haute qualité : caractéristiques et aptitudes microbiologiques à la transformation en Camembert au lait cru. *Thèse à l'Institut de Biologie Appliquée.* Université de Caen Basse-Normandie, France.
65. **Desmaures N., Guéguen M. (1997a).** Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over two years. *J. Dairy Res.* **64**: 271-280.
-

66. **Desmasures N., Bazin F., Guéguen M. (1997b)**. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 53-58.
67. **De Simone C., Ciardi A., Grassi A., Lambert Gardini S., Tzantzoglou S., Trincheri V. (1992)**. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **14**: 331-340.
68. **De Vuyst L., Vandamme E.J. (1994)**. Antimicrobial potential of Lactic acid bacteria, in Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology genetics and applications, Ed. *Blackie Academic and Professional, London*, pp. 91-142.
69. **Drouault S., Corthier G. (2001)**. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet Res.* **32**: 101-117.
70. **Dufossé L., Mabon P., Binet A. (2001)**. Assessment of the coloring strength of *Brevibacterium linens* strains: spectrophotometry versus total carotenoid extraction/quantification. *J. Dairy Sci.* **84**: 354-360.
71. **Duteurtre G. (2003)**. Communication au séminaire « Lait sain pour le Sahel », 25 avril 1^{er} mai 2003, INSAH, ITSLNV, Bamako, Mali.
72. **Duteurtre G., Faye M.D., Dièye P.N., (2010)**. L'agriculture sénégalaise à l'épreuve du marché. Ed. *Karthala, Paris France*. 451p.
73. **Duteurtre V. (2006)**. Etat des lieux de la filière lait et produits laitiers au Sénégal, rapport d'études. Dakar : Projet InfoConseil/MPEA. 94p.
74. **Duthoit F., Godon J. J., Montel M. C. (2003)**. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3840-3848.
75. **Eck A. (1999)**. Le fromage, Ed. *Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France*, 889 p.
76. **El-Baradei G., Delacroix-Buchet A., Ogier J.C. (2008)**. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Int J Food Microbiol.* **121**: 295-301.
77. **El-Baradei G., Delacroix-Buchet A., Ogier J.C. (2007)**. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1248-1255.
78. **Eliskases-Lechner F., Ginzinger W. (1995)**. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneform. *Le Lait.* **75**: 571-584.

79. **Elotmani F., Revol-Junelles A.M., Assobhei O., Millière J.B. (2002).** Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raïb, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr Microbiol.* **44**: 10-17.
80. **Ennahar S., Shashiara T., Sonomoto K., and A. (1999).** Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *Microbiol. Rev.* **24**: 85-106
81. **Ercolini D. (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods.* **56**: 297-314.
82. **Euzéby J.P. (2006).** Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Disponible sur <http://www.bacteriologie.net>. Consulté en novembre 2009.
83. **Feurer C., Vallaes T., Corrieu G., Irlinger F. (2004).** Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft red-smear cheese? *J. Dairy Sci.* **87**: 3189-3197.
84. **Fédération Internationale de laiterie. (1993).** FIL 20B : 1993. Lait : détermination de la teneur en azote, Bruxelles, Fédération Internationale de Laiterie
85. **Fleet G. H. (1999).** Microorganisms in food ecosystems. *Int J Food Microbiol.* **50**: 101-117.
86. **Flynn S., Sinderen D.V.G, Thornton M., Holo H., Nes I.F, Collins J.K. (2002).** Characterization of genetic locus responsible for the production of ABP-118 a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiol.* **148**: 973-984.
87. **Forsman P., Tilsala-Timisjärvi A., Alatossova T. (1997).** Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* **143**: 3491-3500.
88. **Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. H. (2000).** Microbiology of cheese ripening, in Fundamentals of cheese science, Ed., *Aspen Inc., Gaithersburg, Maryland*, pp. 206-232.
89. **Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., Poznanski E. (2009).** Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *I. Dairy J.* **19**: 3-11
90. **Franz C.M., Van Belkum M.J., Holzappel W.H., Abriouel H., Gálvez A. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Microbiol Rev.* **31**: 293-310.

91. **Freney J., Kloos W., Hajek V., Webster J. (1999).** Recommended minimal standards for description of new Staphylococcal species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 489-502.
92. **Frohlich-Wyder M.T. (2003).** Yeast in dairy products, in *Yeasts in Food*, Boekhout and Robert, Ed. *Hamburg: Behrs Verlag, Germany*, pp. 209-237.
93. **Fukushima Y., Miyaguchi S (2007).** Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *Br J. Nutr.* **98**: 969-77.
94. **Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
95. **Furet J.P., Quénée P., Tailliez P. (2004).** Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **97**: 197-207.
96. **German J.B. (1999).** Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nutr Bull.* **24**: 293-299.
97. **Giraffa G. (2002).** *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol Rev.* **26**: 163-171.
98. **Giraffa G (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *J. Food Microbiol.* **88**: 215-222.
99. **Giraffa G., Neviani E. (2001).** DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int J Food Microbiol.* **67**: 19-34.
100. **Gobbetti M., Folkertsma B., Fox P. F., Corsetti A., Smacchi E., De Angelis M., Rossi J., Kilcawley K., Cortini M. (1999).** Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. *Int. Dairy Journal.* **9**: 763-773.
101. **Goldberg J.J., Wildman E.E., Pankey J.W., Kunkel J.R., Howard D.B., Murphy B.M (1992).** The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *J. Dairy Sci.* **75**: 96-104.
102. **Grimont P.A.D (1998).** La taxonomie bactérienne à la fin du XX ième siecle. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13**: 3-5.
103. **Gummalla S., Broadbent J. R. (2001).** Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *J. Dairy Sci.* **84**: 1011-1019.
104. **Haug A., Hostmark A.T., Harstad O.M. (2007).** Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids in Health and Disease.* **6**: 25-47

105. **Hauwuy A., Bornard A., Coulon J.B., Haltel L. (1993).** Performances des vaches laitières en alpage : effet du niveau de la complémentation en aliment concentrés. *INRA Prod. Anim.* **6**: 289-295.
106. **Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M.. (2001).** Detection and quantification of the iap gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbiol.* **152**: 37- 46.
107. **Helinck S., Le Bars D., Moreau D., Yvon M. (2004).** Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3855-3861.
108. **Henri-Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. (2004).** Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of *lactobacilli* in “Camembert de Normandie” cheese. *Le Lait.* **84**: 179-189.
109. **Hermier J. et Accolas J.P. (1989).** Les yaourts et laits fermentés, in Microbiologie alimentaire : Les fermentations alimentaires. Ed. *Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France*, pp. 191-205.
110. **Holzappel W. H., Geisen R., Schillinger U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343-362.
111. **Holzappel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Veld J.H.J. (1998).** Overview of good gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 85-101.
112. **Hoppe-Seyler T., Jaeger B., Bockelmann W., Noordman W. H., Geis A., Heller K. J. (2004).** Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Syst.Appl. Microbiol.* **27**: 211-218.
113. **Irlinger F., Bimet F., Delettre J., Lefèvre M., Grimont P. A. (2004).** *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 457-462.
114. **Irlinger F., Morvan A., El Sohl N., Bergère J. L. (1997).** Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 319-328.
115. **ISO (2001).** Milk-Determination of nitrogen content-Part 1: Kjeldahl method. ISO 8968-1 International Organization of Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
116. **ISO 4833 (2003).** Méthodes horizontales pour le dénombrement des microorganismes. Technique par comptage de colonie à 30°C. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland.

117. **ISO 16649-2 (2001)**. Méthodes horizontales pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland.
118. **ISO 6579 (2002)**. Méthodes horizontales pour la recherche des *Salmonella* spp. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland.
119. **ISO 11290 (2005)**. Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland.
120. **Jakobsen R. A., Heggebo R., Sunde E.B., Skjervheim M. (2011)**. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food microbiol.* **28**: 492-496
121. **Keenan T.W, Patton S. (1995)**. The structure of milk, in Handbook of milk composition, Jensen R.G, Ed. *Academic Press, USA*, pp.5-50.
122. **Kris-Etherton P.M., Pearson T.A., Wan Y., Hargrove R.L., Moriarty K., Fishell V., Etherton T.D. (1999)**. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**: 1009-1015.
123. **Lamontagne M., Champagne C. P., Reitz-Ausseur J., Moineau S., Gardner N., Lamoureux M., Jean J., Fliss I. (2002)**. Microbiologie du lait, in Science et technologie du lait, Vignola C.L., Ed. *Presses Internationales Polytechnique, Québec*, pp. 75-151.
124. **Lamontagne M (2002)**. Produits laitiers fermentés, in Science et technologie du lait, Vignola C.L., Ed. *Presses Internationales, Polytechnique, Québec*, pp. 443-468.
125. **Lane D.L., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. (1985)**. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* **82**: 6955-6959.
126. **Latorre A A., Van Kessel J A. S, Karns J S., Zurakowski M J., Pradhan A.K., Zadoks, R.N., Boor K J., Schukken Y. H. (2009)**. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1315-1323.
127. **Law A. J. R. (1996)**. Effect of heat treatment and acidification on the dissociation of bovine casein micelles. *J. Dairy Res.* **63**: 35-48.
128. **Licitra G., Ogier J. C., Parayre S., Pediliggieri C., Carnemolla T. M., H. Falentin H., Madec M. N., Carpino S., Lortal S. (2007)**. Variability of Bacterial Biofilms of the “Tina” Wood Vats Used in the Ragusano Cheese-Making Process. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6980–6987

129. **Lee D.H., Zo Y.G., Kim, S.J. (1996).** Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3112-3120.
130. **Léonil J., Bos C., Maubois J.L., Tomé D. (2001).** Le lait et ses constituants : biodisponibilité et valeur nutritionnelles, in Protéines, Debry G., Ed., *Tec et Doc, Paris, France*, pp. 45-83.
131. **Leplingard A., Mater D.D., Mogenet A., Michelin R., Seksek I., Marteau P., Doré J., Bresson J.L., Corthier G. (2006).** Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ. Microbiol.* **72**: 5615-5621
132. **Lenoir J. (1984).** The surface flora and its role in the ripening of cheese. *Bulletin of the International Dairy Federation.* **171**: 3-20.
133. **Lewis J.D.N., Thomas L.V., Weir W. (2009).** The potential of probiotic fermented milk products in reducing risk of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* disease. *Int. J. Dairy Technol.* **62**: 461-471.
134. **Lhoste P., Dollev J., Rousseau J., Sohner D. (1993).** Zootechnies des régions chaudes : les systèmes d'élevage. Paris : Ministère de la coopération. CIRAD. 288p.
135. **Loones A. (1994).** Laits fermentés par les bactéries lactiques, in Les bactéries lactiques II, de Roissart H. et Luquet F.M., Ed. *Lorica, France*, pp. 135-154.
136. **Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. (2000).** Initiation à la technologie fromagère. Ed. *Tec. & Doc., Lavoisier, Paris*, 306p.
137. **Mahboba I.A., Ibtisam E.M., El Zubeir (2007).** The compositional Quality of raw milk produced by some dairy cow's farms in Khartoum state, Sudan. *Res. J. Agric. biol. Sci.* **3**: 902-906
138. **Marsh T. L. (1999).** Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 323-327.
139. **Marteau P., Rambaud J.C. (1998).** Probiotiques en gastroentérologie : bases rationnelles, effets démontrés et perspectives. *Hepato-gastroenterology.* **4**: 267-273
140. **Marteau P., Seksik P., Jian R. (2002).** Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br. J. Nutr.* **88**: 51-57.
141. **Marty-Teyssset C., de la Torre F., Garel J. (2000).** Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of NADH oxidase in oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 262-267.

142. **Martín-Platero A.M., Valdivia E., Maqueda M, Martínez-Bueno M. (2009).** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int. J. Food. Microbiol.* **132**: 24-32
143. **Martley F. G., Crow V. L. (1993).** Interaction between Non-Starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* **3**: 461-483.
144. **Masco L., Huys G., De Brandt E., Temmerman R., Swings J. (2005).** Culture-dependent and culture independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 211-230.
145. **Masle I., Morgan F. (2001).** Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques-Facteurs de variation liés à la composition du lait. *Le Lait.* **81**: 561-569.
146. **Mathara J.M., Schillinger U., Kutima P.M., Mbugua S.K., Holzappel W.H. (2004).** Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 269-278.
147. **Maubois J.L. (2008).** Laits et produits laitiers en alimentation humaine : Apports des procédés technologiques. *Bull Acad Natl Med.* **192**: 703-712.
148. **Maubois J.L., Leonil J., Trouve R., Bouhallab S. (1991).** Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire : activités anti-thrombotique et anti-hypertensive. *Le Lait.* **71**: 249-255.
149. **McMahon D.J., McManus W.R. (1998).** Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *J. Dairy Sci.* **81**: 2985-2993
150. **McSweeney P.L.H., Fox P.F., Lucey J.A., Jordan K.N., Cogan T.M. (1993).** Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **3**: 613-634.
151. **Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.D., Katan M.B. (2003).** Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 1146-55.
152. **Metzger R., Centres J.M., Thomas L., Lambert J.C. (1995):** L'approvisionnement des villes africaines en lait et produits laitiers. Etudes FAO, Production et santé animale. N° 124, 101p.
153. **Meyrand A., Vernozy-Rozand C. (1999).** Croissance et entérotoxinogénese de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rév. Méd. Vét.* **150**: 601-616.

-
154. **Mhone T.A., Matope G., Saidi P.T. (2011).** Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *Int. J. Food. Microbiol.* **151**: 223-228
155. **Michel V., Hauwuy A., Chamba J. F. (2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Le Lait.* **81**: 575-592.
156. **Michel V., Hauwuy A., Chamba J. F. (2006).** Gestion de la flore microbienne de laits crus de vache par les pratiques des producteurs. *Renc. Rech. Ruminants.* **13**: 309-312.
157. **Michel V., Hauwuy A., Montel M.C ; Coulon J.B., Chamba J. F. (2005).** **Pratiques d'élevage et composition** microbienne des laits crus. Territoires et enjeux du développement régional. Lyon 9-11 Mars 2005, INRA
158. **Mietton B., Weber F., Desmazeaud M., de Roissart H. (1994).** Transformation du lait en fromage, in Bactéries lactiques II, de Roissart H. et Luquet F.M., Ed. *Lorica, Paris, France.* pp. 55-131.
159. **Millette M, Luquet FM, Lacroix M. (2007).** In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. *Let. Appl. Microbiol.* **44**: 314-9.
160. **Minla'a J.C., Seydi Mg., Aw A., Akollor E., Dione A. (2001).** Qualité hygiénique de quelques denrées alimentaires d'origine animale commercialisées sur le marché dakarais. *Microb. Hyg. Ali.* **13**: 15-20
161. **Morales P., Feliu I., Fernandez-Garcia E., Nunez, M. (2004).** Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *J. Food Prot.* **67**: 567-573.
162. **Mufandaedza J., Viljoen B.C., Feresu S.B., Gadaga T.H. (2006).** Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **108**: 147-52.
163. **Mukulec N., Kalit S., Havranek J., Antunac N., Horvat I., Pripic Z. (2008).** Characteristics of traditional Croatian ewe's cheese from the island of Krk. *Int. J. Dairy Technol.* **61**: 126-132.
164. **Musabyemariya B. (1997).** **Place de la femme dans les systèmes pastoraux au Sénégal : étude de cas à Keur Momar Sarr et à Barkedji.** *Thèse de médecine vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.* 96p.
165. **Muyzer G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 317-322.

166. **Myers R.M., Fischer S.G., Manaitis T., Lerman, L.S. (1985).** Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13:** 3111-3129.
167. **Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. (1999).** Probiotic spectra of lactic acid bacteria, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38:** 13-126.
168. **Neefs J.M., Van de Peer Y., De Rijk P., Chapelle S., De Wachter R. (1993).** Compilation of small subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21:** 3025-3049.
169. **Nikolic M., Terzic-Vidojevic A., Jovcic B., Begovic J., Golic N., Topisirovic L. (2008).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **122:** 162-70.
170. **Obodai M., Dodd C.E. (2006).** Characterization of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, nyarmie, by culture and nonculture-based methods. *J. Appl. Microbiol.* **100:** 1355-1363.
171. **Ogier J.C., Son O, Gruss A, Tailliez P, Delacroix-Buchet A (2002).** Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 3691-3701.
172. **Ogier J.C., Lafarge V., Girard V., Rault A., Maladen V., Gruss A., Leveau J.Y., Delacroix-Buchet A. (2004).** Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70:** 5628-5643.
173. **Ogier J.C., Serror P. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food. Microbiol.* **126:** 291-301.
174. **Ogwaro B.A., Gibson H., Whitehead M., Hill D.J. (2002).** Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **79:** 105-112.
175. **Oliver S.P., Jayarao B.M., Almeida R. A. (2005).** Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* **2:** 115-29.
176. **Oozeer R., Olasupo N.A, Schillinger U., Franz C.M., Holzapfel W.H. (1994).** Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'wara'- a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* **19:** 438-441.
177. **Ouadghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers D., Lefebvre K., Swings J., Amar M. (2009).** Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'lben'. *J. Appl. Microbiol.* **106:** 486-495.

178. **Parente E., Cogan T. M. (2004).** Starter cultures : general aspects, in Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Fox P.F, McSweeney P.L.H, Cogan T.M and Guinee T.P, Ed. *Elsevier, London*, pp. 123-148.
179. **Pudja P., Djerovski J., Radovanović M. (2008).** An autochthonous Serbian product-Kajmak characteristics and production procedures. *Dairy Sci. Technol.* **88**: 163-172.
180. **Rattray F P., Fox P F. (1999).** Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* **82**: 891-909.
181. **Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagace J. (2001).** Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2584-2589.
182. **Saiki R.K, Gelfand D.H, Stoffel S, Scharf S.J, Higuchi R, Horn G.T, Mullis K.B, Erlich H.A. (1985).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 437-491.
183. **Schoder D., Winter P., Kareem A., Baumgartner W., Wagner M (2003).** A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw-milk cheeses produced in the on-farm dairy. *J. Dairy Res.* **70**: 395-401.
184. **Schrezenmeir J., Vrese M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and symbiotics-approaching a definition. *Am. J. Clin Nutr.* **73**: 361-364.
185. **Salminens S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W.M, (1998).** Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.* **44**: 93-106.
186. **Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A. (1995).** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**: 491-497.
187. **Sery A. (2003).** Typologie des fermes laitières périurbaines de Dakar et Thiès. *Thèse de médecine vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.* 102p.
188. **Seydi M. (1993).** Qualité hygiénique du lait reconstitué caillé sénégalais : étude préliminaire. *Dakar médical.* **38**: 61-67.
189. **Solomons N.W. (2002).** Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *Eur J Clin Nutr.* 50-55.
190. **Sraïri M.T, Benhouda H., Kuper M., Le Gal P.Y. (2009).** Effect of cattle management practices on raw milk quality on farms operating in a two-stage dairy chain. *Trop. Anim. Health. Prod.* **41**: 259-272.

191. **Stackebrandt E., Goebel B.M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
192. **Stackebrandt E., Liesack W. (1993).** Nucleic acids and classification, in Handbook of new bacterial systematic, Goodfellow M. And O'Donnell A.G. Ed. *Academic Press Ltd, London.* pp 151-194.
193. **Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491.
194. **St-Gelais D., Tirard-Collet P. (2002).** Fromage, in Science et technologie du lait, Vignola C.L, Ed. *Presses Internationales, Polytechnique, Québec inc,* pp. 349-412.
195. **Stiles M. E., Holzapfel W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* **36**: 1-39.
196. **Swaisgood H.E (1995).** Protein and amino acid composition of bovine milk, in Handbook of milk composition, Jensen R.G, Ed., *Academic Press, USA,* pp. 464-468.
197. **Tailliez P., Beaud D., Ogier J.C. (2002).** Le point sur les outils de classification et d'écologie bactérienne. *Sci. Aliments.* **22**: 5-19.
198. **Thibault H, Aubert-Jacquin C, Goulet O. (2004).** Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* C50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhoea in healthy infants. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* **39**: 147-52.
199. **Tormo H., Agabriel C., Lopez C., Ali Haimoud Lekhal D., Roques C. (2011a).** Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. *Int. J. Dairy Sci.* **6**: 13-28
200. **Tormo H., Delacroix-Buchet A., Lopez C., Ali Haimoud Lekhal D., Roques C. (2011b).** Form management Practices and diversity of dominant bacterial species in raw goat's milk. *Int. J. Dairy Sci.* **6**: 29-43
201. **Tormo H., Ali Haimoud Lekhal D., Laithier C. (2006).** Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. *Renc. Rech. Ruminants.***13**: 305-308.
202. **Tornadijo M E., Garcia M C., Fresno J M., Carballo J. (2001).** Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiol.* **18** : 499-509.

203. **Tuohy K.M, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L, McCartney A.L, Gibson G.R (2007).** Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J Appl Microbiol.* **102**: 1026-1032.
204. **Valdés-Stauber N., Scherer S. (1994).** Isolation and characterisation of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3809-3814.
205. **Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. (2004).** Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett.* **233**: 289-295.
206. **Van der Meulen R., Grosu-Tudor F., Mozzi F., Vaningelgem M., Zamfir G F., De Vuyst (2007).** Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. *Int J Food Microbiol.* **118**: 250-258.
207. **Vassiliadis A., Psoni L., Nikolaou S., Arvanitis L., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2009).** Changes in microbial populations, kinds of lactic acid bacteria and biochemical characteristics of Greek traditional feta cheese during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* **62**: 39-47.
208. **Veysseyre R. (1975).** Technologie du lait III, Ed. *La Maison Rustique, Paris*, 714p.
209. **Vizoso Pinto M.G., Franz C.M., Schillinger U., Holzapfel W.H. (2006).** *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food. Microbiol.* **109**: 205-214.
210. **Wagner M., Horn M., Daims H. (2003).** Fluorescence *in situ* hybridization for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 302-309.
211. **Wayne L G., Brenner D J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L H., Moore W E. C., Murray R J. E., Stackebrandt E., Starr M P., Trüper H. G. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. System. Bacteriol.* **37**: 463-464.
212. **Wessels D., Jooste P. J., Mostert J. F. (1990).** Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **10**: 349-352.
213. **Wu L., Thompson D. K., Li G., Hurt R. A., Tiedje J. M., Zhou J. (2001).** Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5780-5790.

214. **Yvon M., Rijnen L. (2001).** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11**: 185-201.
215. **Zottola E.A. (1994).** Scientific status, summary: microbial attachment and biofilm formation, a new problem for the food industry. *Food Technol.* **48**: 107-117.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THÈSE

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

A ce jour, ce travail a donné lieu à deux publications d'articles originaux dans une revue internationale à comité de lecture et à deux communications orales dans des congrès internationaux.

Articles publiés

- ✚ Caractéristiques technologiques, microbiologiques et chimiques de deux fromages de chèvre produits artisanalement au Sénégal. Revue Africaine de Santé et Productions Animales (**RASPA**), 2009, 7 (2) : 97-103

- ✚ Caractéristiques bactériologiques des laits crus de vache produits au Sénégal. Revue Africaine de Santé et Productions Animales (**RASPA**), 2010, 8 (1) : 33-40

Communications orales :

- ✚ Identification des écosystèmes bactériens des laits fermentés traditionnels sénégalais par les techniques de biologie moléculaire : études préliminaires. Communication présentée lors des XVII Journées médicales, pharmaceutiques, odontologiques et vétérinaires de Dakar, 23-26 février 2009

- ✚ Conditions de production et qualité des laits crus de vache au Sénégal. 16^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Paris, 2-3 décembre 2009

ANNEXES

Annexe 1 : Guide d'entretien et d'observation dans les élevages et unités de transformation laitière

Informations générales

Nom de la ferme : Superficie de l'exploitation: /__ /___/

Superficie réservée à l'élevage : /___/___/

Département : Arrondissement :

Communauté rurale :

Date de démarrage de l'activité :

Activités sur la ferme

	Permanente	Temporaire	Occasionnelle
Production laitière			
Viande bovine/ovine			
Aviculture			
Apiculture			
Agriculture (préciser la spéculation)			
Arbres fruitiers			
Autres (à préciser)			

Races exploitées pour la production laitière

1. :

3. :

2. :

4. :

Structure du troupeau (en nombre)

Vêles :

Veaux :

Génisses :

Taurillons :

Taureaux

Vaches en lactation :

Vaches tarées :

Structure des lactations en lactation

Nombre	1 ^{ère} lactation	2 ^{ème} lactation	3 ^{ème} lactation	+ de 3 lactations
Race locale				
Métis				
Races exotiques				
Autres				

Durée moyenne de lactation par race

1. : 3. :
2. : 4. :

Quantité de lait en litres/jour :

- Destination du lait cru:** autoconsommation transformé sur place
 vente sur place livré à un tiers

Logement des animaux**Aire/salle de repos :**

- Type de revêtement :** Terre battue Terre bétonnée Autre
Type de litière : Paille Copeaux Sciure Autre
Drainage du sol bon (sol sec) moyen mauvais
Fréquence de raclage du sol : 3 fois / jour 2 fois / jour
 1 fois / jour moins d' 1 fois / jour 1 fois/semaine
 1 fois/15 jours 1 fois/mois
Présence de bouses sèches et fraîches oui non
Présence de bouses fraîches seules oui non
Absence ou rareté des bouses fraîches oui non
Désinfection du sol oui non
Fréquence de désinfection :

Aire/salle de traite

- Type de revêtement :** Terre battue Terre bétonnée Autre
Drainage du sol bon (sol sec) moyen mauvais
Fréquence de raclage du sol : 3 fois / jour 2 fois / jour
 1 fois / jour moins d' 1 fois / jour 1 fois/semaine
 1 fois/15 jours 1 fois/mois
Présence de bouses sèches et fraîches oui non
Présence de bouses fraîches seules oui non
Absence ou rareté des bouses fraîches oui non
Désinfection du sol oui non
Fréquence de désinfection :

Hygiène de la traite**Liste et description du matériel utilisé pour la traite et le stockage du lait :**

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Niveau de propreté (visuelle) du matériel de traite : satisfaisant

acceptable non satisfaisant

Appréciation de la nettoyabilité/rinçabilité du matériel : satisfaisant

acceptable non satisfaisant

Lavage du faisceau trayeur Jamais Occasionnel Systématique

Moyen de lavage : eau froide eau chaude

Eau + désinfectant

Lavage des mains avant la traite toujours jamais quelquefois

Port d'habit propre réservé à la traite oui

non

Nettoyage pis avant traite oui

non

Méthode de nettoyage A sec (par essuyage) A eau (par trempage)

Outil d'essuyage : serviette en tissu serviette en papier

Vérification des premiers jets : oui non quelquefois

Nettoyage des trayons après la traite oui non

Produits utilisés pour le nettoyage :

Lavage salle/aire de traite chaque traite chaque jour

Lavage de l'installation chaque traite chaque jour

Produits utilisés pour le lavage de la salle :

Produits utilisés pour le lavage de la machine/ustensile de traite

Désinfection de la machine à traire/ustensile de traite oui non

Fréquence de désinfection : après/avant chaque traite 1 fois/jour 1 fois par semaine Moins d'une fois par semaine Jamais

Suivi médical des animaux

Vétérinaire traitant :

Maladies infectieuses rencontrées ces 3 dernières années :

.....

Maladies parasitaires rencontrées ces 3 dernières

.....

Maladies nutritionnelles rencontrées ces 3 dernières années

.....

Y a-t-il un plan de prophylaxie médicale (vaccin) ? Non oui

Si oui type de vaccins :

Alimentation des vaches laitières**Régime alimentaire de base (en %) :**

Foin :

Concentrés :

Herbes pâturées :

Transformation du lait en lait fermenté et en fromage**Diagramme détaillé de fabrication (bien préciser le temps écoulé entre deux opérations successives)****Liste et description du matériel utilisé pour la fermentation et le stockage du lait fermenté:**

1.

2.

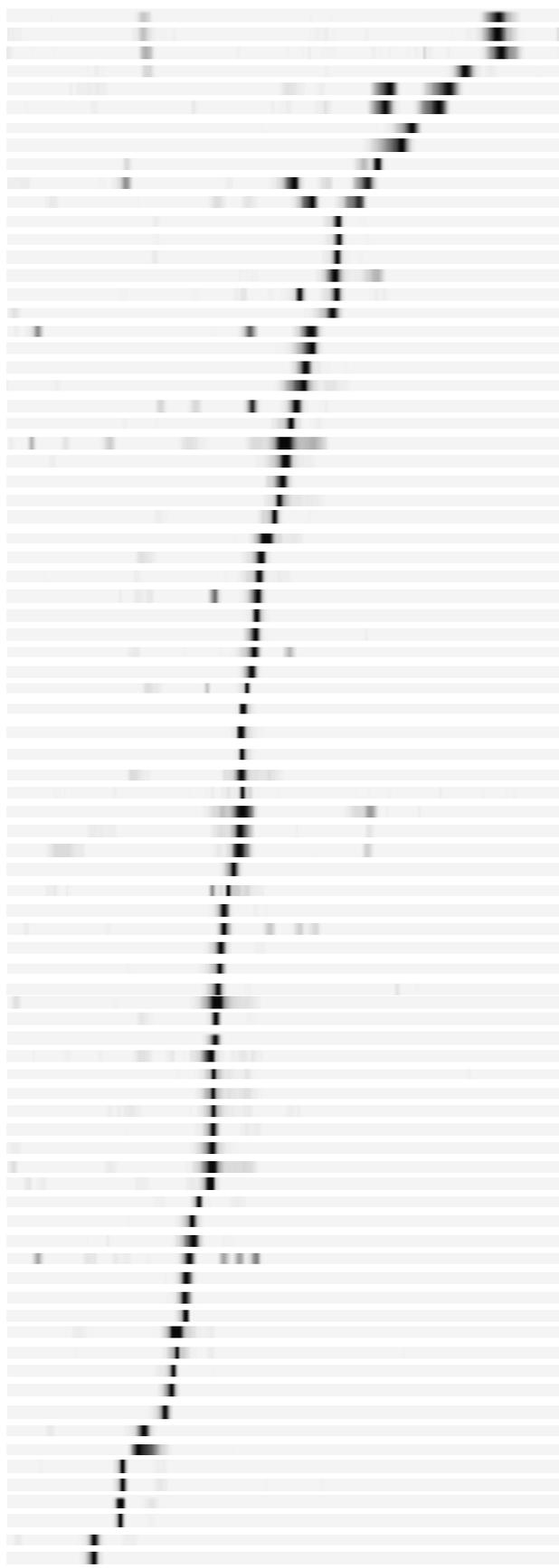
3.

4.

Niveau de propreté (visuelle) du matériel de traite : satisfaisant acceptable non satisfaisant**Appréciation de la nettoyabilité/rinçabilité du matériel :** satisfaisant acceptable non satisfaisant**Lavage des mains avant de manipuler le produit** toujours jamais quelquefois**Port d'habit propre réservé à l'activité** oui non**Nettoyage du matériel de transformation** oui non**Produits de nettoyage :**

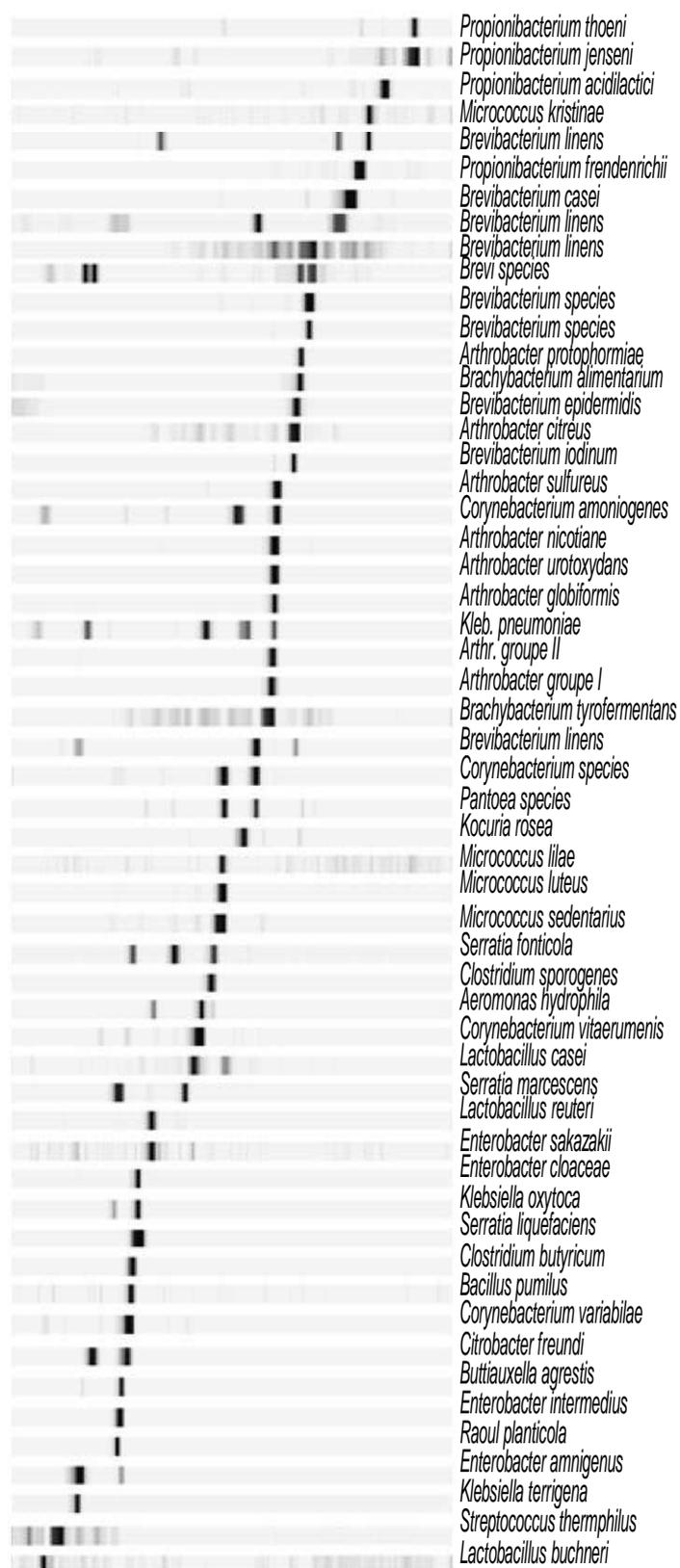
Annexe 2 : Référentiel TTGE utilisé pour l'identification des bactéries bas GC %

i



	Lb rhamnosus
	Lb casei
	Lb paracasei
	Lb reuteri
	bac lichenifor
	bac lentus
	bac subtilis
	E coli
	Stept. thermop
	bac megaterium
	Hafnia alvei
	Lc lactis diac
	Lc lactis crem
	Lc lactis lact
	Alcaligenes fa
	Pc acidilactic
	Ac. species
	Ps alcaligenes
	strep equinus
	Strep dysgalac
	Staph chromo
	Ps fragii
	Staph hyicus
	Bac sphaericus
	Ps stutzeri
	St warneri
	Ec faecalis
	Lc plantarum
	bac circulans
	Pc pentosaceus
	Staph caseolyt
	Sta. haemo
	Lb del lactis
	Strep agalact
	Staph saprophy
	Ps aeruginosa
	Lb del bulgari
	Lb gallinarum
	Lb crispatus
	Lb helveticus
	Lb amylovorus
	Lb acidophilus
	Bre. brevis
	Strep. aga
	Ae. sobria
	Ps putida
	Ec gallinarum
	Chryseobacteri
	acinetobacter
	Weissella para
	Staph xylosus
	Ln lactis
	Ac. baumannii
	Lb brevis
	St haemoly
	Ln pseudomesen
	Ec hirae
	Ec durans
	Ec faecium
	Ln carnosum
	Pseudo fluo
	Alcaligenes to
	Al.tole 5595
	Lc raffinolact
	Staph aureus
	Staph epidermi
	St simulans
	Ln mes cremori
	Ln mes mesente
	Ln mes dextran
	St lentus
	Ec casseliflav
	Lb fermentum
	Listi innocua
	Ln citreum
	Ln fallax
	Ac.woffii 29
	Lb plantarum
	Lb pentosus
	Lb johnsonii
	Lb gasserii
	Lc garviae
	Ps/comspp

Annexe 3 : Référentiel DGGE utilisé pour l'identification des bactéries haut GC %



Référentiel des bactéries haut GC%