

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/20

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

KHEDACHE Zina & SADOUN Amina

Thème

Evaluation de la qualité microbiologique du lait UHT en appliquant les méthodes de bactériologie classique et la cytométrie en flux (D-count)

Soutenu le : 29 / 09 / 2020

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

MESSAD Sara

MCB

Univ. de Bouira

Présidente

SAIT DIB Sabrina

MCB

Univ. de Bouira

Examinatrice

LEZZOUM ATEK Sara

MCB

Univ. de Bouira

Promotrice

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier infiniment et profondément ALLAH LE TOUT PUISSANT de nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience pour réaliser ce travail.

Nos remerciements et notre vive reconnaissance à notre promotrice Mme LEZZOUM ATEK S, d'avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail. Merci pour ses conseils judicieux, sa disponibilité, sa bonne humeur et son sens de l'humour. Nous éprouvons pour vous beaucoup d'estime et énormément de respect.

Nos remerciements vont aux membres de jury, Mme SAIT .S et Mme MESSAD .S d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'elles trouvent dans ces phrases l'expression de notre profond respect.

Nos vifs remerciements à toute l'équipe de la laiterie SOUMMAM précisément : Mr HAMITOUCHE le gérant de l'unité, de nous avoir ouvert les portes de son organisme et, Mme MAHLOUL responsable du laboratoire, pour ses explications très enrichissantes.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce mémoire.

*Nous témoignant enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles
Ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet de fin de cycle.*





Dédicace

Je remercie Dieu, qui illumine ma route à chaque lever, qui me guide sur le droit chemin, qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je suis,

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que faites jusqu'à présent. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur et longue Vie.

A ma chère et adorable sœur : Narimane.

A mon frère : Abdeslam et mon beau-frère Salim.

A mes chères neveux : Melissa et Mayess.

A toute ma famille, en particulier, mon oncle Ahmed.

A ma chère binôme Zina et sa famille.

Aux étudiants de la promotion de microbiologie appliquée 2019/2020.



Amina



Dédicace

Je tiens à remercier tout d'abord le BON DIEU le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie et de m'a donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés. J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la mémoire de mon très cher frère Ghani et ma très chère et adorable sœur Saida qui se sont décédés à la fleur d'âge que j'aimerais pour toujours que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

Aux deux êtres les plus chers au monde mes parents aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez réalisé pour mon instruction et mon bien être. Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement.

Que Dieu vous garde et vous accorde une longue vie.

A ma grand-mère : Messouda.

A mon précieux et adorable frère Said.

A mes très chères sœurs : Naima, Linda.

A mes belles- sœurs : Nacera et Nabila.

A mes neveux : Abdellah, Abderrazak, Bissal et Ilyna.

A toute ma famille.

A ma chère et adorable binôme Amina et sa famille.

Aux étudiants de la promotion de microbiologie appliquée 2019/2020.



Zina

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Synthèse bibliographique

| | |
|--|----|
| Chapitre I : Le lait | 03 |
| I.1. Le lait..... | 03 |
| I.1.1. Histoire du lait | 03 |
| I.1.2. Définition..... | 03 |
| I.1.3. Composition | 03 |
| a. Eau | 04 |
| b. Matière grasse | 04 |
| c. Protéines..... | 05 |
| d. Lactose | 06 |
| e. Minéraux | 06 |
| f. Biocatalyseurs (vitamines et enzymes)..... | 07 |
| I.1.4. Principales caractéristiques du lait | 09 |
| a. Caractéristiques organoleptiques | 09 |
| b. Caractéristiques physicochimiques..... | 09 |
| c. Caractéristiques microbiologiques | 10 |
| I.1.5. Procédés de conservation du lait | 12 |
| I.1.5.1. Par le froid | 12 |
| a. Réfrigération | 12 |
| b. Congélation..... | 12 |
| I.1.5.2. Par la chaleur | 13 |
| a. Pasteurisation | 13 |
| b. Stérilisation | 13 |
| c. Stérilisation à ultra haute température..... | 13 |
| I.2. Le lait UHT..... | 14 |
| I.2.1. Définition..... | 14 |
| I.2.2. Principe et objectifs du traitement thermique UHT | 14 |

| | |
|---|----|
| I.2.3. Composition chimique du lait UHT | 15 |
| I.2.4. Matières premières utilisées dans la fabrication du lait UHT | 15 |
| a. Eau | 15 |
| b. Poudre de lait | 15 |
| I.2.5. Qualité du lait UHT | 16 |
| a. Qualité microbiologique | 16 |
| b. Qualité organoleptique..... | 16 |
| c. Qualité nutritionnelle et énergétique..... | 16 |
| I.2.6. Processus de fabrication du lait UHT | 16 |
| a. Reconstitution du lait | 16 |
| b. Pasteurisation du lait | 17 |
| c. Stérilisation UHT | 18 |
| d. Conditionnement aseptique..... | 18 |
| I.2.7. Réglementation relatif aux laits stérilisés..... | 18 |
| a. Réglementation algérienne..... | 19 |
| b. Réglementation internationale | 19 |
| I.2.8. Avantages et Inconvénients de la stérilisation UHT | 20 |

Chapitre II : Méthodes de vérification de la qualité du lait UHT.....

| | |
|---|----|
| II.1. Objectifs et politique du contrôle microbiologique | 22 |
| II.1.1. Objectifs du contrôle microbiologique..... | 22 |
| II.1.2. Politique du contrôle microbiologique | 23 |
| II.2. Méthodes de contrôle microbiologique classique | 23 |
| II.2.1. Principe | 23 |
| II.2.2. Techniques de numération de microorganismes | 24 |
| II.2.2.1. Numération microscopique | 24 |
| II.2.2.2. Numération sur milieu solide | 24 |
| II.2.2.3. Numération en milieu liquide..... | 24 |
| II.2.3. Identification phénotypiques des bactéries | 24 |
| II.2.4. Avantages et inconvénients | 25 |
| II.3. Méthodes de contrôle microbiologique rapide..... | 25 |
| II.3.1. Cytométrie en flux (CMF) | 26 |
| II.3.1.1. Historique | 26 |
| II.3.1.2. Définition | 27 |
| II.3.1.3. Principe de fonctionnement..... | 27 |
| II.3.1.4. Différents paramètres bactériens analysables par CMF..... | 28 |
| II.3.1.5. Composantes d'un cytomètre | 29 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| II.3.1.6. Fluorochrome | 30 |
| II.3.1.7. Applications | 31 |
| II.3.1.8. Avantages et limites | 31 |

Partie expérimentale

| | |
|--|-----------|
| I. Présentation d'organisme d'accueil : La laiterie Soummam | 33 |
| I.1. Organisation | 33 |
| I.2. Emplacement géographique | 35 |
| I.3. Produits fabriqués | 35 |
| II. Matériel et Méthodes | 36 |
| II.1. Matériel et réactifs utilisés | 36 |
| II.2. Echantillonnage | 39 |
| II.2.1. Poudre de lait | 39 |
| II.2.2. Eau de procès | 40 |
| II.2.3. Produit fini | 40 |
| II.3. Méthodes d'analyses | 41 |
| II.3.1. Analyses sensorielles et physicochimiques | 41 |
| a. Analyses sensorielles | 41 |
| b. Analyses physicochimiques | 42 |
| II.3.2. Analyses microbiologiques | 52 |
| II.3.2.1. Méthode classique | 52 |
| a. Analyses microbiologique de la poudre de lait | 52 |
| b. Analyses microbiologiques de l'eau de procès | 57 |
| c. Analyses microbiologiques du produit fini | 60 |
| II.3.2.2. La cytométrie en flux | 61 |
| II.3.2.3. Epreuve de stabilité du lait UHT | 64 |
| III. Résultats et discussion | 66 |
| III.1. Qualité des matières premières | 66 |
| III.2. Qualité du produit fini | 71 |
| III.2.1. Par la méthode classique | 72 |
| III.2.2. Par la cytométrie en flux | 73 |
| III.3. Epreuve de stabilité du lait UHT | 73 |
| III.4. Comparaison entre les deux méthodes | 75 |
| Conclusion | 77 |

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AFNOR** : Association Française de NORmalisation.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- ATP** : Adénosine Tri-Phosphate
- BCPL** : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol.
- BET** : Bromure d'ETHidium.
- BLBVB** : Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant.
- BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication.
- °C : Degré Celsius.
- CF** : Coliformes Fécaux.
- CMF** : Cytométrie en Flux.
- CSR** : Clostridium Sulfito-Réducteurs.
- CT** : Coliformes Totaux.
- D/C** : Double Concentration.
- DLC** : Date Limite de Consommation.
- ELISA**: Enzyme-Linked Immuno Assay.
- EPT** : Eau Peptonée Tamponée.
- EST** : Extrait Sec Total.
- °f: Degrés français.
- FAO**: Food and Agricultural Organization.
- FAMT** : Flore Mésophile Aérobie Totale.
- IP** : Iodure de Propidium.
- ISO** : International Organization for Standardization.
- JORA** : Journal Officiel de la République Algérienne.
- LR** : Liquide de Ringer.
- MG** : Matière Grasse.
- NPP** : Nombre le Plus Probable.
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- PCA**: Plate Count Agar.
- PCR**: Polymerase Chain Reaction.
- pH** : potentiel d'Hydrogène.
- SARL** : Société A Responsabilité Limitée.

Liste des abréviations

S/C : Simple Concentration.

TBA : Tétra Brique Aseptique.

TR : Tank de Reconstitution.

TS : Tank Stérile.

TT : Tank Tampon.

UFC : Unité Formant Colonie.

UFT : Unité Formant Trouble.

UHT : Ultra Haute Température.

UV : Ultra-Violet.

VF : Viande Foie.

Liste des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|---------|--|------|
| I | Composition moyenne en % du lait de vache, femme, brebis et chèvre | 04 |
| II | Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/l) | 07 |
| III | Composition vitaminique moyenne du lait | 07 |
| IV | Caractéristiques des principaux enzymes du lait | 08 |
| V | Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache | 09 |
| VI | Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l | 15 |
| VII | Les fluorochromes majeurs utilisés pour la détection des microorganismes et la mise en évidence de leur état physiologique ou structural | 30 |
| VIII | Produits fabriqués par les différents ateliers de la laiterie Soummam | 35 |
| IX | Analyses sensoriels effectuées sur la matière première et le produit fini | 41 |
| X | Analyses physico-chimiques effectuées sur la matière première et le produit fini. | 42 |
| XI | Germes recherchés dans la poudre de lait | 53 |
| XII | Les microorganismes recherchés dans l'eau de procès | 57 |
| XIII | Interprétation des résultats d'analyses bactériologiques du produit fini par la cytométrie en flux. | 64 |
| XIV | Les germes recherchés dans le produit fini après étuvage | 65 |
| XV | Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de lait (0 et 26% de MG) | 66 |
| XVI | Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait (0% et 26% de MG). | 67 |

Liste des tableaux

| | | |
|--------|---|------------|
| XVII | Résultats de l'analyse sensorielle de l'eau de procès | 69 |
| XVIII | Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de procès. | 69 |
| XIX | Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de procès | 70 |
| XX | Résultats de l'analyse sensorielle du produit fini avant l'étuvage | 71 |
| XXI | Résultats des analyses physico-chimiques du produit fini avant l'étuvage | 71 |
| XXII | Résultats des analyses microbiologiques du produit fini. | 72 |
| XXIII | Résultats des analyses effectuées sur le produit fini par la Cytométrie en flux | 73 |
| XXIV | Résultats de l'analyse sensorielle du produit fini après l'étuvage | 74 |
| XXV | Résultats des analyses physico-chimiques du produit fini après étuvage | 74 |
| XXVI | Résultats des analyses microbiologiques du produit fini après étuvage | 74 |
| XXVII | Comparaison entre les deux méthodes utilisées pour l'analyse microbiologique du produit fini | 75 |
| XXVIII | Tableau de Mac Grady de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP | Annexe III |

Liste des figures

| Figure | Titre | Page |
|--------|--|-----------|
| 01 | Composition de la matière grasse du lait | 05 |
| 02 | Structure de la micelle et de la sous-micelle de caséine | 06 |
| 03 | Les différents paramètres bactériens analysables par cytométrie en flux | 28 |
| 04 | Organigramme du complexe SOUMMAM | 34 |
| 05 | D-count 50 - Cytomètre de type CHEMUNEX (bioMérieux) | 38 |
| 06 | Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la poudre de lait (0% et 26% de MG) | 68 |
| 07 | Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT. | Annexe II |

Introduction

Le lait est considéré comme l'un des aliments les plus anciens dans l'histoire de l'homme. Vu l'importance et la grandeur des chiffres de production et de consommation de lait dans le monde, la science poursuit ses investigations pour une meilleure maîtrise de ses caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et nutritives (**Legrusse, 2003**).

Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, ils apportent la plus grosse part de protéines d'origine animale (**Mokhtari, 2009**).

Les besoins algériens en lait et produits laitiers sont considérables, avec une consommation moyenne estimée en 2019 à 140 litres par habitant et par an. L'Algérie est considérée comme le plus important pays consommateur de lait dans le Maghreb (**Yekhlef et al., 2010**).

Assurer la disponibilité d'un aliment aussi important à pousser les technologues à développer de nouvelles technologies permettant sa conservation pendant une longue durée (**Sainte Laudy et al., 2009**).

Parmi celles-ci, les traitements à la chaleur sont les plus utilisés dans le domaine laitier notamment, la pasteurisation et la stérilisation à Ultra Haute Température (stérilisation UHT). Ce traitement permet la destruction totale des micro-organismes initialement présents dans le lait. Il est qualifié comme meilleur traitement aboutissant à l'obtention d'un produit "à longue durée de conservation", avec des qualités organoleptiques et nutritionnelles similaires à celles du lait cru (**Guiraud, 1998**).

Pour assurer la qualité de ce produit, des analyses microbiologiques doivent être réalisées et cela, en employant des techniques performantes à différents niveaux, dotées de spécificité, exactitude, précision et praticabilité (**Guiraud et Rosec, 2004**).

Usuellement, des méthodes de bactériologie classique sont utilisées pour l'évaluation de la qualité des produits. Ces dernières sont considérées comme méthodes de références.

De nouvelles techniques sont de plus en plus utilisées afin de répondre aux exigences de l'industriel qui a comme principal objectif la mise à disposition du consommateur d'un produit de bonne qualité en assurant en permanence sa disponibilité sur le marché.

Parmi ces méthodes, la cytométrie en flux est de plus en plus utilisée pour le contrôle de qualité. Elle permet d'acquérir une meilleure maîtrise des caractéristiques microbiologiques des produits en fournissant des résultats fiables dans des délais très courts.

L'objectif de notre travail est :

- ✓ D'évaluer la qualité du lait UHT, en mettant en application deux méthodes d'analyses microbiologiques : la bactériologie classique et la cytométrie en flux ;
- ✓ Comparer les deux méthodes en mettant en avant les avantages et les inconvénients de chacune.

Notre travail comporte deux parties :

- ✓ Une étude bibliographique qui résume les généralités sur le lait et les méthodes de vérification de la qualité du lait UHT ;
- ✓ Une étude expérimentale où sont développés les objectifs de l'étude, le matériel et les méthodes utilisés, les résultats obtenus ainsi une conclusion.

*Synthèse
bibliographique*

Chapitre I

I.1. Le lait

I.1.1. Histoire du lait

Le lait est symbole de fertilité, richesse et abondance. Le lait des animaux a été utilisé dans l'alimentation humaine dès qu'ils ont été domestiqués. Les animaux ont été élevés en premier pour leur viande et leur peau, mais les élever pour leur lait s'est avéré une méthode efficace pour transformer des pâturages incultes en nourriture. Les premières traces d'élevage laitier remontent à 10 000 ans au Moyen-Orient (**Vilain, 2010**).

Dans l'Antiquité, Grecs et Romains prisait le lait de brebis et de chèvre. Les Gaulois possédaient des troupeaux de vaches. La race bovine est devenue la principale productrice de lait. Cependant, le lait, privilège des paysans, restait un produit rare et cher dans les villes, car il ne se conservait pas plus d'une journée (**Vilain, 2010**).

I.1.2. Définition

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (**Pougheon, 2001**).

Selon la réglementation algérienne, la dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait », suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient : lait de chèvre, lait de brebis, etc... (**JORA, 1993**).

Le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou de plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur (**Codex, 1999**).

Le lait doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires, il peut être commercialisé en l'état mais le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour améliorer sa qualité et assurer une plus longue conservation (**Jeantet et al., 2008**).

I.1.3. Composition

La composition du lait varie d'une espèce de mammifère à une autre car elle est adaptée aux besoins de chacune d'elle. Cependant, on retrouve des caractéristiques communes aux différents laits à savoir la richesse en calcium, la qualité protéique appréciable, le lactose comme sucre prédominant et une richesse en vitamines notamment

du groupe B. Sa composition dépend aussi d'autres facteurs tels que la race des vaches, la saison et le climat (Mathieu, 1998) (Tableau I).

Tableau I : Composition moyenne en % du lait de vache, femme, brebis et chèvre (Jensen, 1995).

| Composants | Vache | Femme | Brebis | Chèvre |
|------------|-------|-------|--------|--------|
| Eau | 87.2 | 87.5 | 28.7 | 87.7 |
| Protéines | 3.4 | 1.0 | 2.9 | 5.5 |
| Caséines | 2.8 | 0.4 | 2.5 | 4.6 |
| Lipides | 3.7 | 3.8 | 4.5 | 7.4 |
| Lactose | 4.6 | 7.0 | 4.1 | 4.8 |
| Minéraux | 0.7 | 0.2 | 0.8 | 1.0 |

a. Eau

La valeur nutritive du lait est particulièrement élevée grâce à l'équilibre entre les nutriments qu'il contient. La quantité d'eau dans le lait reflète cet équilibre. Chez tous les animaux, l'eau est le nutriment requis en quantité la plus élevée. Le lait contient un pourcentage élevé en eau (90%) (Wattiaux, 2004) qui se trouve sous deux formes : l'eau libre (96% de la totalité) et l'eau liée à la matière sèche (4% de la totalité) (Ramet, 1985).

L'eau de lait provient du sang par filtration au niveau de la glande mammaire (Codou, 1997).

b. Matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait avec un pourcentage de 3.5 à 6%, sous forme de globules gras d'un diamètre de 0.1 à 10µm suspendus dans l'eau. Chaque globule est entourée par une couche de phospholipides qui empêche ces derniers de se regrouper. Ils sont essentiellement constitués de triglycérides (98%) (Wattiaux, 2004 ; Jeantet *et al.*, 2008) (Figure N° 01).

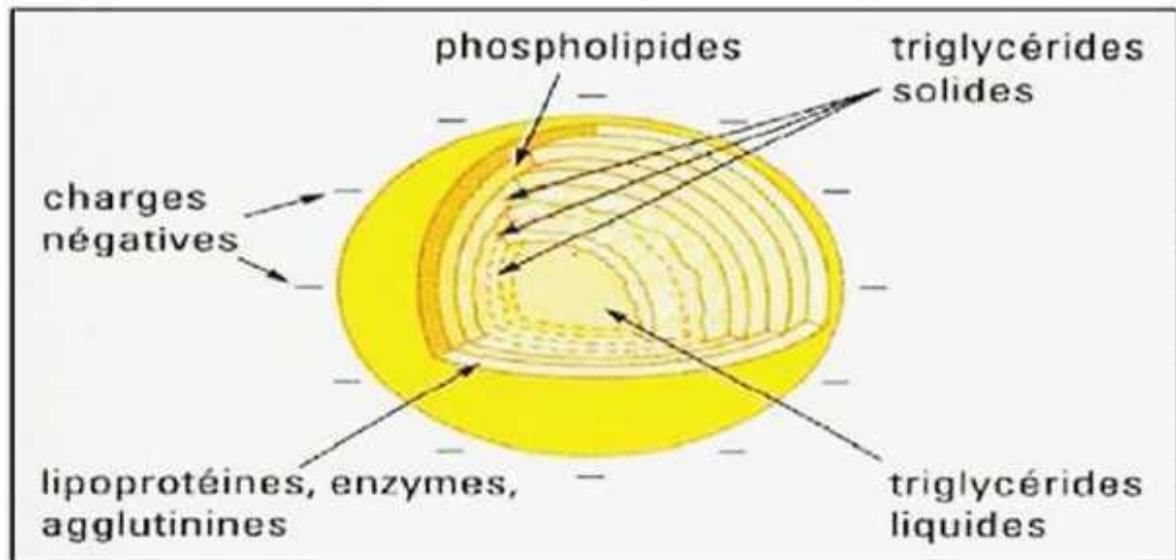


Figure N° 01 : Composition de la matière grasse du lait (Vignola, 2002).

c. Protéines

Le lait de vache contient 3.2 à 3.5% de protéines réparties en deux fractions distinctes :

- Les caséines qui précipitent à un pH de 4.6, elles représentent 80% des protéines totales,
- Les protéines sériques solubles (protéines du lactosérum) précipitent à pH 5.2, elles représentent 20% des protéines totales (Jeantet *et al.*, 2007).

✓ Caséines

Le mot vient du latin "Caseus" qui veut dire fromage. La caséine est une protéine composée de différents fragments : $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ et K . La dernière (K signifiant kappa) permet au lait de rester homogène et ne pas décanter. Elle est riche en acides aminés et en phosphore. C'est un composant azoté du lait qui précipite après adjonction de présure (enzyme digestive protéolytique provenant des caillettes de veau) (Christopher, 2009) (Figure 02).

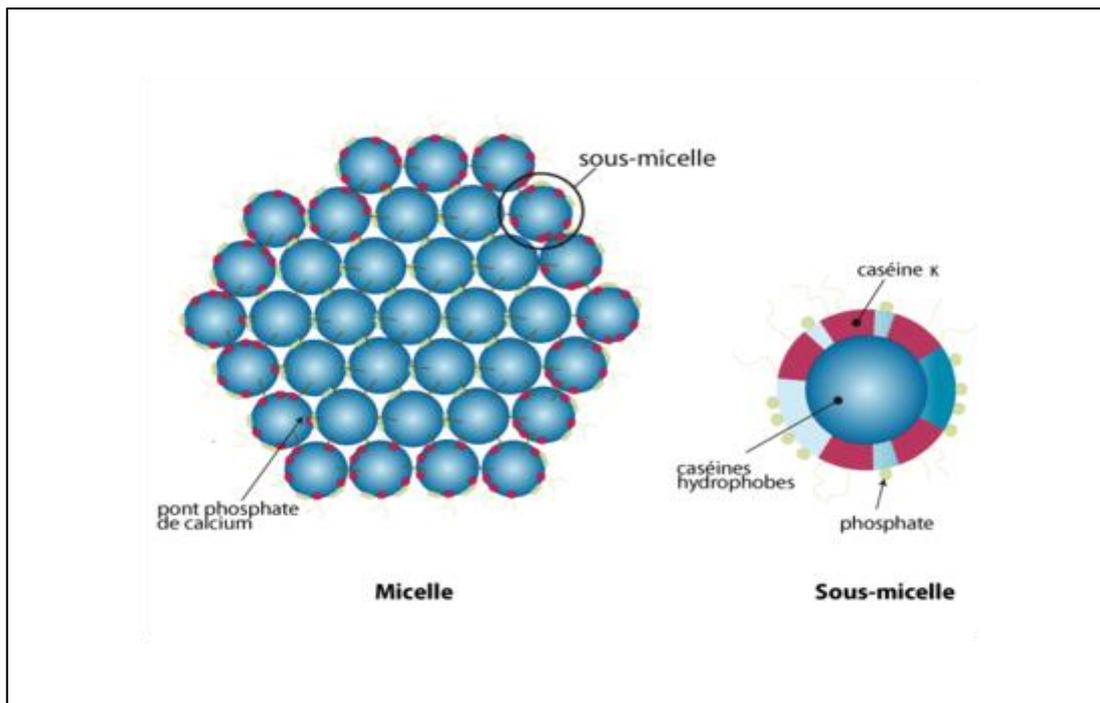


Figure N° 02 : Structure de la micelle et de la sous-micelle de caséine (Vignola, 2002).

✓ Protéines du lactosérum

Ces protéines ont une bonne valeur nutritionnelle, car elles sont riches en lysine, tryptophane et acides aminés soufrés. Elles ont une structure compacte stabilisée par des ponts disulfure. Ce sont des protéines qui sont sensibles au traitement thermique à une température comprise entre 75 et 95°C (Cheftel et Lorient, 1982).

d. Lactose

Le lactose est le sucre principal (ou hydrate de carbone) naturellement présent dans le lait et les produits laitiers. Le lactose est composé de glucose et de galactose, deux sucres simples utilisés directement par notre corps comme source d'énergie.

e. Minéraux

La matière minérale et saline du lait est d'environ 9 g/l. Elle est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. En effet, le lait contient tous les éléments minéraux indispensables à l'organisme. Les matières minérales ne se sont pas exclusivement sous la forme de sels solubles (molécules et ions) ; une partie importante se trouve dans la phase colloïdale insoluble (micelles de caséines).

Le lait contient également les oligo-éléments indispensables pour l'organisme humain tels que le zinc, le fer, le cuivre, le fluor, l'iode et le molybdène (Pougheon, 2001) (Tableau II).

Tableau II : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/l)

| Minéraux (g/l) | 7 |
|-----------------------------|------|
| Calcium | 1.25 |
| Phosphore | 1.00 |
| Magnésium | 0.12 |
| Sodium | 0.50 |
| Potassium | 1.25 |
| Chlore | 1.00 |
| Autres (soufre, citrate...) | 1.8 |

f. Biocatalyseurs (Vitamines et Enzymes)

✓ Vitamines

Les vitamines sont nécessaires à la croissance et au fonctionnement normal des processus vitaux, mais l'organisme humain est incapable de les synthétiser, il doit donc puiser ces sources dans l'alimentation. On classe les vitamines en deux grandes catégories :

- Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait.
- Les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie.

Le lait et ses dérivés sont des sources assez riches en vitamine A, B12 et B2 ; un peu moins en vitamine B1, B6 et B3 ; par contre, ils ne contiennent que peu de vitamines E, d'acide folique et de biotine (**Pougheon, 2001**) (**Tableau III**).

Tableau III : Composition vitaminique moyenne du lait (**Amiot et al ., 2002**).

| Vitamines | Teneur moyenne/100ml |
|------------------------------------|----------------------|
| Vitamines liposolubles | |
| Vitamine A (carotènes) | 40µg |
| Vitamine D | 2.4µg |
| Vitamine E | 100µg |
| Vitamine K | 5µg |
| Vitamines hydrosolubles | |
| Vitamine C (acide ascorbique) | 2mg |
| Vitamine B ₁ (thiamine) | 45µg |

| | |
|--|--------|
| Vitamine B ₂ (riboflavine) | 175µg |
| Vitamine B ₆ (pyridoxine) | 50µg |
| Vitamine B ₁₂ (cyanocobalamine) | 0.45µg |
| Niacine (B3) et niacinamide | 90µg |
| Acide pantothénique | 350µg |
| Acide folique | 5.5µg |
| Vitamine H (biotine) | 3.5µg |

✓ Enzymes

Pougheon (2001) définit les enzymes comme des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Environ 60 enzymes principales ont été répertoriées dans le lait dont 20 sont des constituants natifs. Une grande partie se retrouve dans la membrane des globules gras mais le lait contient de nombreuses cellules (leucocytes, bactéries) qui élaborent des enzymes. La distinction entre éléments natifs et éléments extérieurs n'est donc pas facile (**Tableau IV**).

Tableau IV : Caractéristiques des principaux enzymes du lait (**Vignola, 2002**).

| Groupe d'enzyme | Classes d'enzymes | pH d'activité maximale | Température d'activité maximale (°C) | Substrats |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------------------|---|
| Hydrolases | Estérases | | | |
| | Lipases | 8.5 | 37 | Triglycérides |
| | Phosphatase alcaline | 9-10 | 37 | Esters phosphoriques |
| | Phosphatase acide | 4.0-5.2 | 37 | Esters phosphoriques |
| | Protéases | | | |
| | Lysozyme | 7.5 | 37 | Parois cellulaire microbienne |
| | Plasmine | 8 | 37 | Caséines |
| Déshydrogénases ou Oxydases | Sulfhydryle oxydase | 7 | 37 | Protéines, peptides |
| | Xanthine oxydase | 8.3 | 37 | Bases puriques |
| Oxygénases | Lactoperoxydase | 6.8 | 20 | Composés réducteurs+H ₂ O ₂ |
| | Catalase | 7 | 20 | H ₂ O ₂ |

I.1.4. Principales caractéristiques du lait

a. Caractéristiques organoleptique de lait

Le lait est un liquide biologique comestible deux fois plus visqueux que l'eau, il est opaque, blanc, d'une saveur douceâtre et d'une odeur peu accentuée (Billon, 2009).

b. Caractéristiques physico-chimiques du lait

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

Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques du lait de vache (Majoub *et al.*, 1993).

| Caractéristiques | Valeurs |
|----------------------------------|-------------|
| Densité à 15°C | 1030 – 1034 |
| Température spécifique | 0,93 |
| Point de congélation | - 0,55°C |
| pH | 6,6 à 6,8 |
| Acidité exprimée en degré Dornic | 16 à 18 |
| Indice de réfraction à 20°C | 1,35 |
| Point d'ébullition | 100,16°C |

✓ Masse volumique

La masse volumique d'un liquide est définie par le quotient de la masse d'une certaine quantité de ce liquide divisée par son volume. Elle est habituellement notée ρ et s'exprime en Kg.m^{-3} dans le système métrique. Comme la masse volumique dépend étroitement de la température, il est nécessaire de préciser à quelle température (T) elle est déterminée.

La masse volumique du lait entier à 20°C et en moyenne de 1030Kg.m^{-3} (Pointurier, 2003).

✓ La densité

La densité désigne le rapport entre la masse d'un volume donné du liquide considéré et la masse du même volume d'eau. Comme la masse volumique de l'eau à 4°C est pratiquement égale à 1000Kg.m^{-3} , la densité du lait à 20°C par rapport à l'eau à 4°C est d'environ 1.030 (d20/4). Il convient de signaler que le terme anglais «density» prête à confusion puisqu'il désigne la masse volumique et non la densité (Pointurier, 2003).

✓ Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau pure puisque la présence de solides solubilisés abaisse le point de congélation (**Neville et Jensen, 1995**).

La mesure du point de congélation du lait est couramment utilisée pour contrôler l'absence de mouillage lors de la traite, de la conservation ou de la collecte. Le cas échéant, la quantité d'eau additionnée est évaluée en comparant cette mesure au point de congélation authentique du lait, qui est normalement compris entre - 0,525 et - 0,530° C (**Parciel et al., 1994**).

✓ Point d'ébullition

L'ébullition propre du lait a lieu de 100,15°C à 100,17°C voire 100,55°C. Cependant à une température voisine de 80 à 90°C, lorsqu'on porte le lait sur le feu, il y a montée du lait c'est-à-dire formation d'une membrane protéinocalcaire ou peau du lait (frangipane) qui gêne l'ébullition du lait (**Bouix et Leveau, 1980**).

On définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés (**Vignola, 2002**).

✓ L'acidité de lait

Dès sa sortie du pis de la vache, le lait a une certaine acidité qui due principalement à la présence des protéines (surtout les caséines et les lactalbumines), de substances minérales telles que les phosphates et le gaz carbonique, ainsi que des acides organiques, le plus souvent l'acide citrique (**Amariglio, 1986**).

Un lait frais normal à une acidité titrable de 16 à 18° Dornic c'est à dire 16 à 18 en décigrammes d'acide lactique par litre (**Veisseyre, 1975**), c'est une mesure indirecte de sa richesse en caséine et en phosphates. Dans les laits en voie d'altération, cette acidité titrable augmente (en raison de la dégradation du lactose en d'autres acides en plus de l'acide lactique) (**Amariglio, 1986**).

c. Caractéristiques microbiologiques du lait

Le lait est un aliment dont la durée de vie est très limitée. En effet, son pH voisin de la neutralité le rend très facilement altérable par les microorganismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal aux nombreux microorganismes comme les moisissures, les levures et les bactéries.

✓ Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes, lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes /ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi les streptocoques lactiques (*Lactococcus* et *Lactobacillus*). Le lait cru est protégé contre les bactéries par la substance inhibitrice appelée la lacténine mais leur action est de très courte durée.

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade : ils sont généralement pathogènes et dangereux au point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites : streptocoques pyogènes, les corynébactéries pyogènes, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella*, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis* et quelques virus

Les germes banaux du pis ne présentent pas de danger sanitaire mais peuvent se développer abondamment dans le lait (**Guiraud, 2003**).

✓ Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (**Vignola, 2002**).

Les contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Corynébactéries*, *Bacillus* ; par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries (coliformes) et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia* etc. Ce qui explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (**Leyral et Vierling, 2007**).

Les principales sources de contamination sont :

- 1- **L'ambiance** : l'atmosphère des étables est souvent chargée de germes provenant des excréments, de la paille et des aliments. Ces germes sont véhiculés sous forme de poussière qui se dépose peu à peu (**Boubezari, 2010**).
- 2- **L'état de l'animal** : Les saletés se trouvant dans le lait proviennent le plus souvent de la chute, au moment de la traite, des particules d'excréments, de terre, de végétaux

ou de litière, attachées à la peau de l'animal et aussi des poils et des cellules épithéliales, exemple : peuvent contaminer le lait au moment de la traite.

- 3- **L'état d'hygiène de la traite** : La contamination du lait par ces bactéries est souvent due à une mauvaise hygiène de la traite (contamination de la mamelle par l'environnement ou par un matériel de traite mal entretenu) ou par contamination externe par l'intermédiaire d'aliments ou eau souillés (*Clostridium*) (**Legry, 1988**).
- 4- **Les ustensiles et les machines** : Ils sont habituellement la source de contamination la plus importante. Des milliards de germes peuvent exister sur les parois d'ustensiles laitiers mal lavés et mal séchés. La machine à traire mal nettoyée est certainement une source de contamination d'une importance considérable (**Heuchel et al., 2001**).
- 5- **La qualité de l'eau** : Les eaux impures servant au rinçage des récipients et des machines peuvent être la cause de contaminations très gênantes (**Dumoulin et Peretz, 1993**).

I.1.5. Procédés de conservation du lait

L'industrie laitière recherche en permanence de nouvelles techniques de conservation du lait avec comme objectif d'obtenir un lait qui se conserve longtemps sans altérer les qualités nutritionnelles et organoleptiques (**Lortal et Delage, 2008**).

Pour assurer la conservation et l'assainissement du lait, la technologie fait appel à divers procédés.

I.1.5.2. Le froid

Le froid est un moyen très pratique pour conserver les aliments, tout en préservant leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques.

a. Réfrigération

La réfrigération est une technique de semi conservation, utilisée pour le stockage des denrées alimentaires à des basses températures (supérieures à 0°C). Elle a pour effet de ralentir les réactions enzymatiques et chimiques, et par conséquent la multiplication et le métabolisme des microorganismes, mais elle ne permet qu'une conservation relativement courte (quelques jours) (**Jeantet et al., 2006**).

b. Congélation

La congélation est un procédé physique désignant le changement d'état d'eau liquide en glace afin d'inhiber, retarder ou arrêter les réactions enzymatiques et la croissance des microorganismes.

La congélation permet de conserver les aliments plusieurs mois, c'est l'action de soumettre des produits alimentaires au froid (à -30°C) afin de les conserver (à -18°C). **(Boumendjel, 2005).**

I.1.5.1. La chaleur

Contrairement à l'action du froid, la chaleur permet de détruire la plupart des microorganismes et non d'inhiber simplement leur développement. D'autre part elle vise à détruire les enzymes qui peuvent impliquer la détérioration du lait. Ce qui permet l'amélioration de la qualité du lait **(Ainseri et Allou, 2012).**

a. Pasteurisation

La pasteurisation est un processus de traitement thermique qui vise à détruire certains micro-organismes présents dans le lait.

Ce processus consiste à un traitement thermique qui varie en fonction du couple temps-température oscillant entre 15 à 20 secondes pour des températures allant de 72 à 85°C .

Cependant, le lait pasteurisé contient toujours une flore résiduelle (bactéries lactiques) dont le développement doit être empêché en réfrigérant le lait immédiatement et rapidement après la pasteurisation à une température comprise entre 2 et 4°C puis conservé à cette température jusqu'à sa consommation **(Noblet, 2012).**

b. Stérilisation

La stérilisation est un traitement utilisé pour détruire tous les germes du lait. Ce dernier est chauffé pendant 10 à 20 minutes à $115-120^{\circ}\text{C}$, directement dans sa bouteille hermétiquement close. Ce type de traitement peut avoir un impact sur la qualité organoleptique **(Noblet, 2012).**

c. Stérilisation à ultra-haute température (UHT)

C'est une technique permettant la longue conservation (quelques mois) du lait et des produits alimentaires en les exposant à un chauffage bref et intense, qui détruit les microorganismes présents dans le produit **(Joffin et Joffin, 2003).**

Le lait est chauffé à $135-140^{\circ}\text{C}$ pendant 2 secondes, puis conditionné dans un emballage stérile. La destruction des germes est totale. Ce type de traitement à haute température et de plus courte durée permet de ne pas altérer les qualités organoleptiques du lait. Ce lait est le plus consommé de nos jours dans le monde **(Noblet, 2012).**

I.2. Le lait UHT

L'utilisation du traitement UHT (ultra haute température) a bouleversé le mode de conditionnement et de distribution du lait.

Cette nouvelle technique avait été mise au point en Suisse en 1951, mais son intérêt économique se manifesta quand elle fut associée au conditionnement en carton développé par la société suédoise Tétrapak. En 1962, la première chaîne de traitement UHT avec conditionnement aseptique en carton démarrait en Suisse. Le procédé fut adopté dans les autres pays au cours des années 60 (**Boisard, 1994**).

I.2.1. Définition

Le lait UHT est un lait traité par la chaleur, dans le but de détruire les enzymes et les microorganismes. Il est conditionné ensuite aseptiquement dans un récipient stérile hermétiquement clos, étanche aux liquides et aux microorganismes. Le traitement thermique peut être soit direct ou indirect (**Luquet, 1990**).

En fonction de sa teneur en matière grasse, le lait UHT peut être classé en :

- Lait UHT entier : sa teneur en matière grasse est de 2,8% au minimum (28 g de matière grasse au minimum par litre de lait).
- Lait UHT partiellement écrémé : sa teneur en matière grasse est de 1,5% à 2% (15 à 20 g de matière grasse par litre de lait).
- Lait UHT écrémé : sa teneur en matière grasse est de 0,15% (1,5 g de matière grasse par litre de lait) (**JORA N°69, 2003**).

I.2.2. Principe et objectifs du traitement thermique UHT

La méthode repose sur l'efficacité bactériologique d'un traitement thermique à haute température (135 à 150°C) maintenue pendant un temps très court (2 à 10s).

Les méthodes de chauffage utilisées pour réaliser la stérilisation UHT sont deux types :

- Le chauffage indirect à l'aide d'un échangeur thermique tubulaire ou à plaques sans qu'il ne soit en contact direct avec la source de chaleur
- Le chauffage direct par injection de vapeur d'eau, à une température allant de 135°C à 150°C pendant 2 à 5 secondes (**Veisseyre, 1975**).

Elle a pour objectif :

- D'assurer une conservation définitive ou du moins très longue du lait par destruction thermique des germes ;
- D'assurer sa stabilité et sa valeur nutritive assez longtemps pour satisfaire les exigences commerciales (**Veisseyre, 1975**).

I.2.3. Composition chimique de lait UHT

La composition des différents types de lait UHT est représentée dans le **tableau VI**.

Tableau VI : Composition moyenne des différents types de lait UHT en g/l (**Feinberg et al., 1987**).

| Constituants | Lait stérilisé UHT g/l | | |
|-------------------------|------------------------|------------------|-------------|
| | Lait entier | Lait demi écrémé | Lait écrémé |
| Eau | 878 | 896 | 910 |
| EST (Extrait Sec Total) | 122 | 164 | 90 |
| Azote totale | 5 | 5 | 5.2 |
| Protéines | 31.9 | 31.9 | 32.9 |
| Lipides | 35.4 | 15.4 | 2 |
| Glucides | 44.7 | 45.3 | 45.4 |

I.2.4. Matières premières utilisées dans la fabrication du lait UHT

a. L'eau

Elle est l'une des matières premières de tous les produits laitiers reconstitués et recombines. Elle doit être potable et de bonne qualité microbiologique, c'est-à-dire ne pas contenir de germes pathogènes. Sur un plan physico-chimique, elle ne doit pas contenir des traces de pesticides ou de nitrates, avoir une dureté totale comprise entre 0 et 15 et un pH voisin de la neutralité (**Gosta, 1995**).

b. La poudre de lait

La poudre de lait est constituée de lait déshydraté. Ce dernier a l'avantage de se conserver plus longtemps que le lait liquide sans avoir besoin d'être stocké au réfrigérateur.

C'est un produit solide obtenu directement par l'élimination de l'eau du lait par séchage quasi-total du lait liquide.

La poudre de lait a une humidité résiduelle de 2,5 à 4%. Un pourcentage si bas d'eau diminue considérablement les risques de développement microbien et assure au lait en poudre une meilleure conservation pour de longues périodes jusqu'à un an à température ambiante (**Michel et al., 2002**).

I.2.5. Qualité du lait UHT

a. Qualité microbiologique

Tous les organismes pathogènes courants susceptibles d'apparaître dans le lait sont tués par le traitement UHT. Il existe toutefois un risque de résistance de spores de certains germes comme *Clostridium* et *Bacillus*, et des enzymes thermostables naturelles du lait, n'ayant qu'un très léger effet sur les propriétés physiques du lait (Gosta, 1995 ; Valero *et al.*, 2001).

b. Qualité organoleptique

La couleur du lait après stérilisation UHT reste blanche. Il a un goût de cuit faible grâce à la température élevée et la durée très courte du traitement (Sechet, 2001). La qualité organoleptique du lait UHT est considérée comme supérieure à celle du lait stérilisé classique (Mottar et Naudts, 1979).

c. Qualité nutritionnelle et énergétique

L'apport calorique passe de 64 Kcal pour le lait entier à 45 Kcal pour le lait demi écrémé et 33 Kcal pour le lait écrémé. La rapidité du traitement thermique UHT permet de préserver la qualité nutritionnelle du lait. En effet, le lactose, la matière grasse et les sels minéraux ne subissent aucune modification, mais on constate une modification limitée de celle des protéines et des vitamines (Gosta, 1995).

I.2.6. Processus de fabrication du lait UHT

La production des briques de lait passe par plusieurs étapes successives au niveau de l'atelier de production de la laiterie.

La fabrication du lait UHT se fait en quatre grandes étapes :

- ✓ Reconstitution du lait ;
- ✓ Pasteurisation ;
- ✓ Stérilisation à UHT ;
- ✓ Conditionnement aseptique.

a. Reconstitution du lait

La reconstitution du lait consiste à mélanger la poudre du lait (0% ou 26%), avec l'eau de processus (15°f) à une température de 22 à 25 °C afin d'obtenir un produit fini dont la teneur en matière grasse est de 16 g/l (1,5 à 2%) (FAO, 1995).

✓ Inclusion de la poudre

La poudre de lait est incluse progressivement et manuellement en quantités mesurées dans un tank duquel elle est soutirée vers un triblinder où elle sera mélangée avec l'eau de

procès. Le mélange est ensuite acheminé vers les tanks de reconstitution (TR) (Moller, 2000).

✓ **Agitation et filtration**

Les tanks de reconstitution sont équipés d'un système d'agitation permettant ainsi d'éviter la formation de grosses particules de lait et aussi, éviter la sédimentation au fond des tanks.

L'agitation a pour but d'augmenter la dispersion, et favorise l'hydratation afin d'éviter la formation d'agglomérats (Avezard, 1980).

Lorsque toute la poudre est bien mélangée, l'agitateur s'arrête et le contenu du tank est laissé au repos jusqu'à la dissolution complète de la poudre, c'est le temps d'hydratation qui est d'environ une heure (Moller, 2000).

Ensuite, le lait est soutiré à travers des filtres pour éliminer tout ce qui n'est pas dissout et bien mélangé.

✓ **Réfrigération**

Le lait reconstitué et filtré est ensuite acheminé vers un échangeur de chaleur à plaques où il est refroidit à 5°C par l'eau glacée (Moller, 2000).

b. Pasteurisation du lait

b.1. Préchauffage

Le lait reconstitué demi écrémé est pompé vers l'échangeur à plaque, dans la section de préchauffage où il est chauffé à une température de 68°C (Gosta, 1995).

b.2. Dégazage

Le lait préchauffé à 68 °C est introduit tangentiellement dans la cuve sous vide. Les gaz véhiculés à la vapeur montent vers le haut de la chambre et sont aspirés par la pompe sous vide, et la vapeur se condense dans le condenseur et revient dans le lait (Moller, 2000).

Le dégazage a pour but :

- ✓ D'éliminer certaines odeurs caractéristiques du lait ;
- ✓ D'éliminer les substances volatiles dans le lait reconstitué, ainsi d'éliminer l'oxygène pouvant oxyder la matière grasse du lait (FAO, 1995).

b.3. Homogénéisation

Après dégazage, le lait UHT passe dans l'homogénéisateur où il va subir un traitement physique par pression à 60 bars. Le but de l'homogénéisation est de réduire la taille des globules gras à environ 1/5ème de leur taille initiale. Les micelles de caséine seront aussi partiellement détruites (Cheftel et Cheftel, 1996).

b.4. Pasteurisation proprement dite

Le lait sort de l'homogénéisateur à une température de 60°C, il est conduit vers l'échangeur à plaque pour être chauffé à 90°C pendant 30 secondes dans le chambreur (Moller, 2000).

Une fois pasteurisé, le lait passe par la dernière section pour subir un refroidissement à 5°C à l'aide d'un circuit d'eau glacée et est stocké dans des tanks tampons (TT).

c. Stérilisation UHT

c.1. Préchauffage

Le lait pasteurisé stocké au niveau des tanks tampon est pompé vers le bac de lancement de l'installation UHT, puis vers la section de chauffage pour chauffer à 75°C, pour améliorer la qualité organoleptique et la stabilité du lait UHT (Gosta, 1995).

c.2. Homogénéisation

Le lait préchauffé subit une deuxième homogénéisation à 200 bars avant de gagner la section chauffage. Elle permet d'améliorer la consistance et la stabilité du lait au cours de sa longue conservation (Gosta, 1995).

c.3. Stérilisation proprement dite

Le lait homogénéisé gagne la section de chauffage de l'échangeur à plaques, où il est chauffé à 140°C dans un circuit fermé pour empêcher toute contamination du produit par les microorganismes de l'air (Gosta, 1995). Le produit passe ainsi par plusieurs phases successives et rapides de chauffage et refroidissement jusqu'à une température de $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

d. Conditionnement aseptique

Le produit est conditionné aseptiquement à l'aide d'une conditionneuse aseptique (Tétra Brick Aseptique, (TBA)) pour éviter toute recontamination du produit. Les récipients utilisés sont sous forme tétraédrique (tétra-pack) d'un volume d'un litre. Ils sont formés de quatre couches de matériaux à savoir, du polyéthylène, du plastique, de l'aluminium et du papier. Ils sont opaques, imperméables aux gaz, à l'eau et à la lumière, sans saveur ni odeur et d'utilisation facile. Ils sont préalablement stérilisés par un jet de peroxyde d'hydrogène à 35% (Boumar, 2019).

Le processus de fabrication de lait UHT demi écrémé est illustré dans l'**annexe II**.

I.2.7. Réglementation relatif aux laits stérilisés

Le but principal de l'établissement des normes est de protéger la santé des consommateurs. Elles sont également utiles pour l'application des lois et règlements

concernant le contrôle des aliments ; ainsi que lors d'échanges commerciaux entre pays (Semasaka, 1986).

a. Réglementation algérienne

La réglementation algérienne qui régit le contrôle de la qualité du lait UHT est représentée par les textes législatifs parus au JORADP N° 69 de l'année 1993 et le JORADP N° 39 de l'année 2017. Les laits stérilisés et stérilisés à UHT :

- Doivent rester stables jusqu'à leur date limite de consommation.

En outre, ils ne doivent pas :

- Contenir un nombre de micro-organismes aérobies à 30° C supérieur à 10 par 0,1 millilitre.
- Présenter de défauts organoleptiques tels que la protéolyse et les anomalies de goût ou d'odeur ;
- Coaguler, précipiter ou flocculer à l'ébullition ;
- Présenter une acidité titrable supérieure à 1,8 grammes par litre d'acide lactique ;
- Avoir une variation de pH supérieure à 0,2 unité, du fait de l'incubation ;

b. Réglementation internationale

La maîtrise du problème de sécurité sanitaire, en France et en Europe à titre d'exemple, passe par une intensification des contrôles, en particulier microbiologiques, en tous points de la chaîne de production et de distribution. Sous la responsabilité de l'industriel, ou mené par un organisme public, chacun de ces contrôles s'inscrit dans un cadre législatif de plus en plus strict (Rouillard, 2004).

Le journal officiel des communautés européennes de 1990 a fixé les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait de consommation traité thermiquement :

- Les procédés de chauffage, les températures et la durée du chauffage pour les laits pasteurisés, UHT et stérilisé, les types d'appareils de chauffage, la vanne de dérivation, les types de dispositif de réglage de la température et des enregistreurs doivent être approuvés par les services compétents et être conformes aux normes internationales en la matière. Les documents de vérification doivent être présentés à toute réquisition des services du contrôle habilités ;
- Dans le cas où le procédé de traitement du lait dit « à ultra haute température » est appliqué par contact direct du lait et de la vapeur d'eau, celle-ci doit être obtenue à partir d'eau potable et ne doit pas céder des substances étrangères au lait ni exercer

sur lui une influence défavorable. En outre, l'application du procédé ne doit pas modifier la teneur en eau du lait traité ;

- Le lait stérilisé doit avoir été chauffé et stérilisé dans des conditionnements ou récipients hermétiquement fermés, le dispositif de fermeture devant rester intact ;
- La durée de conservation des laits stérilisés et des laits stérilisés U.H.T. entre la date du traitement de stérilisation et la date limite de consommation est fixée sous la responsabilité du fabricant. Elle doit être au plus égale à :
 - 90 jours pour les laits stérilisés UHT ;
 - 150 jours pour les laits stérilisés.
- Le lait UHT doit avoir une conservabilité telle qu'en cas de contrôle par sondage aucune altération ne soit perceptible, au bout de quinze jours, sur du lait UHT maintenu dans un emballage non ouvert à une température de +30° C ; un séjour de sept jours dans un emballage non ouvert à une température de 55° C peut en outre être prévu.

I.2.8. Avantages et Inconvénients de la stérilisation UHT

a. Avantages

Le traitement UHT :

- Offre, en particulier le double avantage d'une longue conservation du lait de consommation sans besoin de réfrigération (**Vignola, 2002**).
- Détruit rapidement les microorganismes, tout en minimisant les modifications des constituants du lait (**Douad et al., 1985**).
- Permet une conservation de la plupart des vitamines du lait, même pour les vitamines thermosensibles B1, B12 et l'acide folique (au maximum 20 % des vitamines sont détruites lors du chauffage).
- Limite aussi la modification de la matière grasse, une faible dénaturation des protéines et l'amélioration de leur digestibilité dans l'estomac ainsi qu'une précipitation partielle des sels minéraux, ce qui fait du lait UHT un aliment de bonne qualité nutritionnelle presque semblable à celle du lait cru (**Debry, 2001**).

b. Inconvénients

Au cours du stockage, le lait traité par traitement UHT peut présenter deux types d'instabilités :

- La formation de sédiments dont une couche de nature protéique.
- L'augmentation de la viscosité jusqu'à la formation éventuelle d'un gel (**Cayot et**

Lorient, 1998).

- les traitements UHT ne parviennent pas à inhiber totalement les activités de protéolyses dues à des protéases extracellulaires de certaines bactéries notamment les psychrotrophes (**Fairbairn et Law, 1986**).

Chapitre II

II. Méthodes de vérification de la qualité du lait UHT

La recherche de la qualité est actuellement une préoccupation fondamentale pour l'industrie agro-alimentaire.

La qualité se définit à partir d'un système de référence, exemple : normes et labels, comme étant l'ensemble des caractéristiques d'un produit qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites. Il est également précisé que ces besoins « peuvent inclure des aspects de performance, de facilité d'emploi, de sécurité, des aspects relatifs à l'environnement, des aspects économiques etc...Elle s'obtient par l'application de procédures bien définies et maîtrisées et se contrôle par des systèmes de vérification et des méthodes d'analyses standardisées (**Faradji-Hamma, 2016**). Celles concernant la détection de micro-organismes dans les aliments sont habituellement considérées comme des méthodes classiques, en grande partie parce que l'objectif est de fournir une méthode fiable, reproductible, si possible simple (et peu coûteuse) et reconnue au niveau international qui permettent d'obtenir des résultats équivalents dans différents laboratoires. Elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans les produits alimentaires notamment le lait afin d'en maîtriser leur présence ou absence et leur nombre (**Cuq, 2007**). Dans cette perspective, au cours des dernières années, de nombreuses méthodes alternatives pour la détection et le dénombrement de micro-organismes dans les aliments ont été développées, suite aux avancées en immunologie, biotechnologie et instrumentation (**Anonyme, 2017**).

II.1. Objectifs et politique du contrôle microbiologique

II.1.1. Objectifs du contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique des aliments a pour objectif de contrôler les caractères fondamentaux d'un produit alimentaire ainsi d'assurer sa sécurité et sa salubrité à toutes les étapes de la chaîne alimentaire.

La salubrité est une assurance qu'un aliment ne nuira pas aux consommateurs c'est-à-dire l'absence d'action toxique, de microorganismes pathogènes ou toxigènes ainsi que le niveau des populations des germes d'altération (**Andrews, 1996**) lorsqu'il est préparé et /ou consommé suivant l'usage auquel ils sont destinés (**World Health Organization, 1997**).

Le contrôle des aliments est l'activité réglementaire de mise en application obligatoire, par les autorités nationales ou locale, des textes en vigueur en vue d'assurer la protection du consommateur et de veiller à ce que pendant la production, la manipulation et

l'entreposage, la transformation et la distribution, tous les produits alimentaires soient sans danger, sains et propres à la consommation humaine ; conformes aux règles de qualité et de sécurité.

II.1.2. Politique du contrôle microbiologique

Le contrôle traditionnel de la qualité se concentrait souvent sur le produit fini. Ce contrôle final permettait de déceler les produits non-conformes. Au fil du temps, ces systèmes traditionnels se sont révélés insuffisants car ils n'apportaient pas toutes les garanties nécessaires au consommateur.

Afin de remédier à cette situation, la solution était de mettre en place une gestion préventive du procédé de production. Dans la gestion préventive, on contrôle toutes les étapes du processus de production (de la réception des ingrédients à l'emballage et l'étiquetage du produit fini) et on minimise les risques de contamination en prenant des précautions et des mesures adéquates. Lorsque les différentes étapes sont sous contrôle, le produit fini répondra aux normes de qualité (**Rouillard, 2004**).

II.2. Méthodes de contrôle microbiologique classique

En raison de sa richesse en nutriments, le lait constitue un excellent milieu de culture pour les microorganismes, c'est la raison pour laquelle les altérations d'origine microbienne sont plus fréquentes (**Madi et Merabet, 2013**).

II.2.1. Principe

La stérilité ou la qualité microbiologique d'un produit peuvent être estimées par l'effet sur celui-ci de la croissance du ou des micro-organismes (acidification, dégagement de gaz, etc...). La plupart des analyses officielles se font sur des milieux nutritifs gélosés coulés dans des boîtes de pétri. Des échantillons liquides de produit (broyé et remis en solution si nécessaire) sont déposés dans les boîtes sur des milieux sélectifs. Il n'existe pas de milieu pour cultiver simultanément toutes les bactéries, qu'elles soient aérobies, anaérobies, thermophiles, mésophiles, exigeantes ou non, fermentant les sucres ou non. Plusieurs milieux différents sont donc utilisés, afin de dénombrer et de rechercher des populations bactériennes d'intérêt particulier (**Rouillard, 2004**).

Ce dénombrement effectué dans l'analyse type d'un aliment constitue un indicateur de la qualité sanitaire et reflète l'histoire du produit (**Cuq, 2007**).

Les résultats obtenus sont comparés aux critères microbiologiques établis par des commissions de spécialistes au sein d'organismes comme l'AFNOR, OMS, FAO et le Codex alimentarius. Ces normes et critères microbiologiques donnent en générale les limites de

conformité, de même que les méthodes à utiliser (**Guiraud, 2003**). Ces dernières sont publiées dans des documents officiels ou législatifs (tel que le journal officiel à titre d'exemple).

II.2.2. Techniques de numération de microorganismes

II.2.2.1. Numération microscopique

Les techniques de numération microscopique offrent une possibilité de détecter les microorganismes lors de contrôle de produits, simplement en regardant un échantillon directement sous microscope optique. Bien qu'il soit généralement relativement facile de repérer, avec soin et patience, les bactéries, les levures et les moisissures à l'état frais, il est possible de réaliser des colorations afin de rendre ces microorganismes plus facilement visibles, ainsi les deux colorations couramment employées sont la coloration simple au bleu de méthylène et la coloration complexe (double) de Gram.

Dans le cas du lait, il est nécessaire de diluer l'échantillon ce qui permettra de réduire la concentration de microorganismes et de constituants supplémentaires (**Naimi, 2019**).

II.2.2.2. Numération sur milieu solide

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) présents dans l'inoculum (**Cuq, 2007**).

II.2.2.3. Numération en milieu liquide

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification. Cette méthode repose sur le fait qu'un inoculum contenant au minimum un germe UFT (Unité formant trouble) donnera, après introduction dans un milieu liquide donné, une culture positive. Dans cette technique, la disponibilité des nutriments pour le micro-organisme est excellente (**Cuq, 2007**).

II.2.3. Identification phénotypiques des bactéries

De nombreux caractères sont exploités pour identifier une bactérie, déjà isolé à l'état pur (**Naimi, 2019**).

Les méthodes phénotypiques comprennent toutes les techniques ne faisant pas appel aux acides nucléiques et reposants sur la détermination de caractéristiques morphologiques,

physiologiques et biochimiques des bactéries via des techniques standardisées (**Alauzet, 2009**).

II.2.4. Avantages et inconvénients

a. Inconvénients

Ils résident principalement dans :

- La faible précision du mode de détection ; malgré l'apparition d'appareils automatiques qui permettent d'étaler puis de dénombrer les colonies à la surface d'une boîte de Pétri, le meilleur dispositif reste encore le bras et l'œil humains (**Rouillard, 2004**).
- La recherche d'un groupe particulier de bactéries parmi d'autres peut être extrêmement difficile (**Joffin et Joffin, 2003**).
- La phase de détection ne peut être réalisée qu'après une phase de croissance du micro-organisme. Dans le meilleur des cas, elle est unique et se réalise sur la boîte de Pétri. Mais souvent, un étalement et une croissance directement sur la gélose ne permettent pas de détecter un nombre suffisant de bactéries, par conséquent, l'échantillon doit être préalablement enrichi, ce qui implique une ou plusieurs phases de croissance supplémentaires.

Les vitesses de croissance des micro-organismes sont extrêmement variables, mais on peut considérer que pour les plus rapides, une phase de croissance nécessitera 24 à 48 heures (**Rouillard, 2004**).

b. Avantages

Ces techniques présentent malgré tout un certain nombre d'avantages. Le principal est sans aucun doute le coût. Le matériel utilisé est peu onéreux, et la plus grande part du temps utilisé pour ces techniques est dédiée à attendre que les micro-organismes se développent, ce qui ne nécessite aucune intervention humaine. Aussi, les compétences techniques nécessaires à la réalisation de ces méthodes sont largement répandues. Enfin, et en conséquence des deux points précédents, ces techniques représentent toujours aujourd'hui une référence établie en microbiologie (**Rouillard, 2004**).

II.3. Méthodes de contrôle microbiologique rapide

Le contrôle de la qualité microbiologique du lait UHT constitue une problématique majeure en termes sanitaire et économique. L'efficacité des traitements appliqués est actuellement vérifiée par des méthodes standards basées sur la mise en culture des microorganismes. Cependant, leur mise en œuvre permet d'obtenir des résultats qui ne

présentent qu'une vision partielle de la population microbienne présente dans un échantillon et ça dans un délai qui n'est pas compatible avec le niveau de réactivité requis dans le domaine de la gestion des produits laitiers (**Helmi, 2016**).

Plusieurs travaux visaient à démontrer que l'application des techniques dites rapides permet, selon les cas, de réduire le délai de réponse, ce qui en fait des outils très prisés dans l'industrie agro- alimentaire.

Parmi les principales techniques rapides utilisées en microbiologie des aliments, nous pouvons citer

- Les méthodes immunologiques, pour la plupart de type ELISA. ;
- Les techniques de biologie moléculaire, hybridation sur colonies ou Polymerase Chain Reaction (PCR) ;
- L'impédancemétrie ;
- Le dosage par bioluminescence de l'adénosine triphosphate (ATP) cellulaire ou ATP.métrie ;
- Les procédés d'analyse d'image après filtration et coloration des échantillons et la cytométrie en flux (CMF) (**Bornert, 2000**).

Cette dernière est utilisée depuis plus de 30 ans dans le domaine de la biologie cellulaire des eucaryotes, et fait même maintenant partie des techniques utilisées en routine.

Depuis quelques années, des travaux visant à étendre ses applications à l'analyse des cellules procaryotes, notamment des bactéries, ont vu le jour. Ce sont des microbiologistes spécialisés dans l'analyse des bactéries de l'environnement, et notamment de l'hydrologie marine, qui ont les premiers développé ce type d'applications, travaillant sur des microorganismes naturellement en suspension et ne poussant pas sur les milieux usuels de bactériologie. La CMF permet, comme la microscopie, d'analyser des cellules individuelles mais permet de plus une analyse multiparamétrique, en temps réel, des populations, en combinant précision, facilité de multiplication des mesures et rapidité d'acquisition des données (**Chau et al., 2008**).

II.3.1. Cytométrie en flux (CMF)

II.3.1.1. Historique

Les performances de cette technique sont le fruit de travail de biophysiciens, chimistes, biologistes, informaticiens qui, d'année en année, ont apporté leur contribution à l'évolution de la CMF :

- ✎ **En 1934**, Moldavan introduit le concept de comptage de cellules par mesure d'extinction des signaux lors du passage des cellules circulant dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique.
- ✎ **En 1942**, Coons, Creech et Jones utilisent des anticorps couplés à une molécule fluorescente, l'anthracène, pour la détection de pneumocoques grâce à une source excitation UV ;
- ✎ **En 1970**, Van Dilla équipe les premiers appareils d'une source laser appelée cytofluograph qui permet simultanément la mesure de la taille et de la fluorescence verte et rouge ;
- ✎ **En 1972**, Herzenberg et *al.* développent un nouvel appareil, appelé fluorescence activated cell sorter (FACS) qui marquera le début de la commercialisation des cytomètres ;
- ✎ Puis au cours des années **1980 à 1990**, les cytomètres évoluent constamment en termes d'optique, informatique, traitement des données. En parallèle, de nouveaux marqueurs fluorescents sont disponibles dans le commerce ;
- ✎ Enfin à partir des années **1990**, les cytomètres, devenant de plus en plus performants, ont permis l'analyse de cellules plus petites, telles que les bactéries, et aujourd'hui, certains scientifiques analysent des éléments encore plus petits, tels que des virus libres ou des virus marins (**Chau et al., 2008**).

II.3.1.2. Définition

La cytométrie (cyto = cellule ; métrie = mesure) en flux est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse (plusieurs milliers d'événements par seconde), de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien. L'interaction de ces éléments avec la lumière émise par une ou plusieurs sources lumineuses (lasers en général) permet de caractériser les cellules selon différents critères (**Zafrani et Monneret, 2017**).

II.3.1.3. Principe de fonctionnement

Deux principes fondamentaux caractérisent la cytométrie en flux :

- Le guidage des cellules en suspension à l'aide d'un flux laminaire liquide assurant leur défilement en « file indienne », devant un système d'illumination ;
- L'utilisation d'un système d'illumination et de détection suffisamment performant pour effectuer l'analyse d'une cellule donnée dans un temps très court, de l'ordre de quelques microsecondes.

Le principe conventionnel de fonctionnement consiste à guider et aligner (par surpression ou aspiration) dans une gaine liquide, de manière hydrodynamique et à vitesse constante, une suspension de particules isolées (cellules, constituants subcellulaires : noyaux, chromosomes, mitochondries ou microorganismes) (Ronot et Pierrez, 1990).

II.3.1.4. Différents paramètres bactériens analysables par CMF

La CMF permet d'étudier de nombreux paramètres, parmi lesquels le potentiel de membrane, l'intégrité membranaire, des activités enzymatiques, certaines structures nucléaires ou antigéniques, et le niveau d'expression de certains gènes grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs fluorescents (Figure N° 03) (Chau *et al.*, 2008).

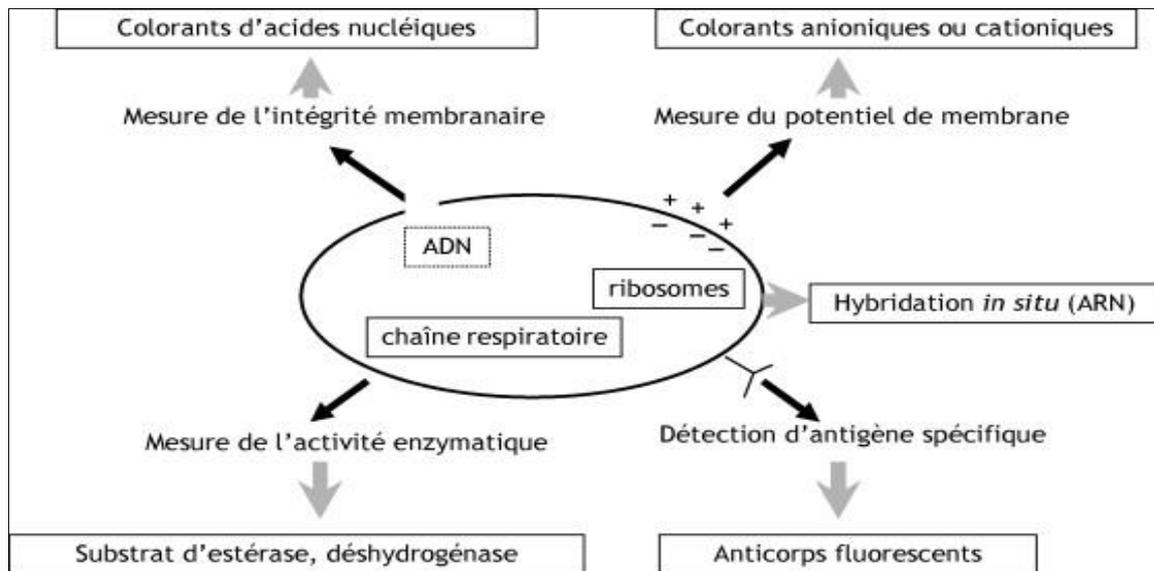


Figure N° 03 : Les différents paramètres bactériens analysables par cytométrie en flux (Chau *et al.*, 2008).

a. Le potentiel de membrane

La mesure du potentiel de membrane représente la différence de potentiel électrique entre l'extérieur et l'intérieur de la bactérie qui se manifeste par un excès de charges négatives sur la face interne de la paroi. On utilise des sondes cationiques comme le 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6) ou la rhodamine 123 ou à l'inverse des sondes anioniques dont le niveau de captation est proportionnel au potentiel transmembranaire.

Le potentiel de membrane joue un rôle essentiel dans le processus de croissance bactérienne (Chau *et al.*, 2008).

b. Les activités enzymatiques

Deux principales activités enzymatiques peuvent être étudiées : l'activité déshydrogénase et l'activité estérase. Ces activités enzymatiques sont explorées en

employant des substrats non fluorescents qui, une fois dégradés par l'activité enzymatique étudiée, rendent la cellule fluorescente par hydrolyse du substrat.

Ces enzymes donnent des informations sur l'activité métabolique de la bactérie. (Chau *et al.*, 2008)

c. L'intégrité membranaire

La perte de l'intégrité membranaire est corrélée à la mort cellulaire. L'intégrité membranaire est analysée grâce à l'utilisation d'un colorant incapable de franchir les membranes intactes. La coloration cellulaire traduit une perméabilité et donc une altération membranaire. Plusieurs colorants de ce type sont disponibles, par exemple l'iodure de propidium (IP) et le bromure d'éthidium (BET)

L'analyse de l'intégrité membranaire est souvent couplée à l'analyse d'autres activités fonctionnelles, en analyse multiparamétrique (Chau *et al.*, 2008).

d. La détection spécifique des acides nucléiques

Elle repose sur l'utilisation de sondes oligonucléotides fluorescentes spécifiques de l'ARN, par exemple l'hybridation in situ avec des sondes ciblant les ARN 16 S, dans un but d'identification d'espèce bactérienne. (Chau *et al.*, 2008)

e. La détection spécifique d'antigène

Les structures antigéniques (membranaires ou intracellulaires) sont révélées par des anticorps monoclonaux en marquage direct ou indirect comme pour les marquages des cellules eucaryotes. Mais cette technique est limitée par la disponibilité réduite sur le marché d'anticorps monoclonaux bactériens. (Chau *et al.*, 2008)

II.3.1.5. Composantes d'un cytomètre

Le cytomètre de flux se décompose en trois parties distinctes : fluidiques, optiques et électroniques, gérées au moyen d'une interface informatique (Frouin, 2004).

➤ Système fluidique

Une suspension de cellules est injectée dans la cellule de mesure où elles passent en file indienne devant un laser qui est orthogonale à l'écoulement. Ceci est basé sur le principe de focalisation hydrodynamique de l'échantillon jet ; le liquide de gaine injecté et l'échantillon s'écoulent en flux laminaire (Rieseberg *et al.*, 2001).

➤ Système optique

Un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) (Zafrani et Monneret, 2017).

➤ **Système électronique**

Un système électronique pour convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts). Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être amplifiés, numérisés et stockés dans un ordinateur (**Zafrani et Monneret, 2017**).

➤ **Système informatique**

Un système informatique pour visualiser ces signaux. (**Zafrani et Monneret, 2017**).

II.3.1.6. Fluorochrome

✓ **Définition**

Un marqueur fluorescent (ou fluorochrome) est une molécule capable d'émettre une lumière de fluorescence après excitation par une source lumineuse. Chaque marqueur fluorescent permet de mettre en évidence un état physiologique ou un état structural donné pour les bactéries présentes dans un échantillon (**Helmi, 2016**).

✓ **Principaux fluorochromes utilisés**

Les principaux fluorochromes utilisés pour la détection des microorganismes et la mise en évidence de leur état physiologique et structural sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII : Les fluorochromes majeurs utilisés pour la détection des microorganismes et la mise en évidence de leur état physiologique ou structural (**Helmi, 2016**).

| Nom | Absorption | Emission | Cible |
|---|-------------------|-----------------|--------------------------------------|
| 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) | 344 | 449 | ADN (A-T sélectif) |
| Iodure de propidium (PI) | 536 | 617 | ADN |
| Chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium (CTC) | 400/450 | 602 | Activité enzymatique déshydrogénase |
| Chemchrome V6 (CV6) | 480 | 500 | Activité enzymatique estérase |
| 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) | 494 | 520 | Activité enzymatique estérase |
| Rhodamine 123 | 541 | 572 | Potentiel membranaire – mitochondrie |

II.3.1.7. Applications

La cytométrie en flux est devenue un instrument essentiel, quotidiennement utilisé en biologie et en recherche biomédicale (**Ronot et Pierrez, 1990**).

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la CMF. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

En cancérologie, la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale.

De nombreuses études **en pharmacologie** font aussi appel à des techniques de CMF : mise au point ou étude de drogues antimitotique, immunothérapie, etc... (**Duperray et al., 1993**)

Depuis quelques années, des travaux visant à étendre ses applications à l'analyse des cellules procaryotes, notamment des bactéries, ont vu le jour. Ce sont des microbiologistes spécialisés dans l'analyse des bactéries de l'environnement, et notamment de l'hydrologie marine, qui étaient les premiers à développer ce type d'applications, travaillant sur des microorganismes naturellement en suspension et ne poussant pas sur les milieux usuels de bactériologie. (**Chau et al., 2008**)

II.3.1.8. Avantages et limites

a. Avantages

- La cytométrie en flux présente de réels avantages en termes de simplicité, de rapidité et de sensibilité et permet l'analyse de multi paramètre bactérien non étudiable par les méthodes classiques de bactériologie.
- Elle permet une analyse rapide et sur un grand nombre d'éléments. La vitesse d'analyse varie de 200 à 20 000 cellules par seconde. Les protocoles de coloration sont courts (10 à 30 minutes maximum) et la lecture se fait en temps réel.
- Elle permet également une analyse quantitative et multiparamétrique. Il est, en effet, possible de mesurer simultanément deux paramètres de morphologie et plusieurs paramètres de fluorescence suivant le cytomètre utilisé.
- Il s'agit de méthodes rapides permettant d'analyser différents états physiologiques.

- Elles permettent ainsi des prises de décisions rapides et l'application de mesures correctrices. Dans la plupart des cas, elles contribuent en outre à économiser du matériel et des heures de travail (**Chau *et al.*, 2008**)
- L'apport majeur de la cytométrie est de pouvoir aborder les populations cellulaires dans leur grande diversité et complexité (**El Hentati *et al.*, 2009**).

b. Limites

- Des difficultés peuvent survenir lors de la pénétration de certains colorants en raison de la nature polysaccharidique de la paroi des bactéries.
- L'activité métabolique en constante évolution chez les micro-organismes vivants peut compliquer l'interprétation des résultats en fonction de l'état physiologique (**Chau *et al.*, 2008**)
- Les cellules doivent être en suspension. Il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de cellules (**Faradji-Hamma, 2016**).
- Et enfin, Le coût des appareils reste aujourd'hui encore très élevé (**Chau *et al.*, 2008**)

Partie

expérimentale

I. Présentation d'organisme d'accueil

L'entreprise a été fondée par la famille HAMITOUCHE en 1993 à Akbou (Bejaia).

Elle a comme activités la production, la commercialisation et la distribution de produits laitiers frais.

Après avoir couvert une grande partie du marché national, la Laiterie Soummam se tourne vers les marchés étrangers. Des opérations d'exportation sont réalisées vers la Libye, la Mauritanie et le Qatar. L'entreprise a comme objectifs de s'ouvrir d'avantage sur d'autres marchés internationaux.

I.1. Organisation

La laiterie Soummam est présidée par Mr HAMITOUCHE Lounis. Il dirige les différentes structures administratives.

L'unité fonctionne avec un effectif total de 1600 salariés permanents, elle dispose de quatre sites de production, d'une capacité cumulée de plus de 2000 T/jour. Elle commercialise sa production à travers un très grand réseau de distribution à l'échelle nationale et internationale.

Soummam est le leader incontesté dans son créneau sur le marché Algérien avec une part de marché de plus de 50 %, dont, une production et une commercialisation de près de 500 000 T/AN et une capacité de production annuelle de plus de 700 000 T/AN, répartie sur quatre ateliers de production :

- SOUMMAM 1
- SOUMMAM 2
- SOUMMAM 3
- SOUMMAM 4

La structure organisationnelle de l'entreprise Soummam repose sur un modèle hiérarchique classique. Les différentes Directions de cette entreprise sont représentées sur la figure N° 04.

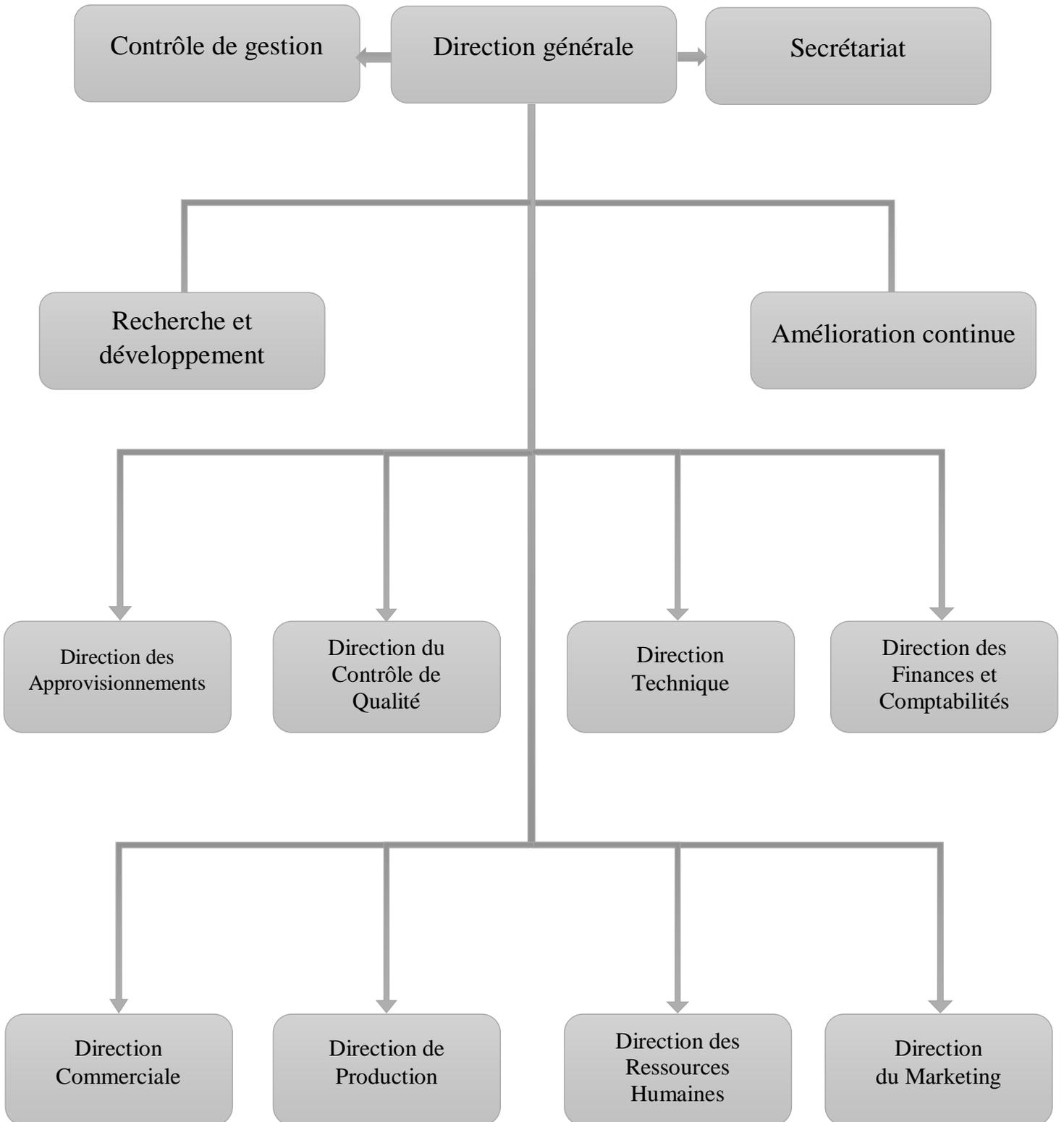


Figure N° 04 : Organigramme du complexe SOUMMAM

I.2. Emplacement géographique

L'usine de production et le siège de laiterie Soummam se situent dans la zone industrielle TAHARACHT D'AKBOU, dans la wilaya de Bejaia, en plus de quatre dépôts régionaux dans les wilayas d'Alger, Annaba, Oran et Constantine, auxquels sont acheminés ses produits par le biais de sa propre flotte ou par des transporteurs externes à l'entreprise.

I.3. Produits fabriqués

Soummam propose une riche gamme composée de plus de 40 références de produits différents se déclinant en une grande variété d'arômes, de fruits, d'emballages (pot, bouteille, briks) et de conditionnements (100g, 70g, 90g, 1L, 170 g, 100 ml ...).

L'ensemble des produits fabriqués en fonction de leur atelier de production est résumé dans le tableau N° VIII.

Tableau N° VIII : Produits fabriqués par les différents ateliers

| Ateliers | Familles de produits |
|------------------|-----------------------------|
| Soummam 1 | Yaourt étuvé |
| Soummam 2 | Fromages frais |
| | Dessert L'ben, Raïb |
| Soummam 3 | Yaourt brassé |
| | Jus au lait |
| | Yaourt à boire |
| Soummam 4 | Lait UHT |
| | Crème fraîche |

Matériel et

Méthodes

II. Matériel et méthodes

❖ Objectif du travail

La présente étude a pour objectif d'évaluer la qualité du lait UHT, en mettant en application deux méthodes d'analyses microbiologiques : la bactériologie classique et la cytométrie en flux.

Les résultats obtenus vont nous permettre de comparer les deux méthodes et de mettre en avant les avantages et les inconvénients de chacune d'elles. A cause de la crise du COVID 19, ce stage n'a pas pu être prolongé. Les résultats de certains tests nous ont été transmis après la fin du stage.

Cette étude a été effectuée dans la laiterie Soummam, durant la période allant du 01/03/2020 au 17/03/2020.

II.1. Matériel et réactifs utilisés

II.1.1. Analyse physicochimique

➤ Matériel

| Verreries | Appareillages | Outils |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acidimètre ▪ Flacon de 250 ml ▪ Butyromètres de poudre de lait ▪ Pipettes de 02 et 10 ml ▪ Tubes à essai capacité 20 ml ▪ Erlenmeyer de 250 ml ▪ Pro pipette ▪ Fiole jaugée de 25 ml | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Milkoscan FT 120 ▪ Bain marie réglé à 40 °C ▪ Bain marie (STUART) ▪ Balance (Denver Instrument xx-2001) ▪ Mixeur ▪ Centrifugeuse ▪ Dessicateur Sartorius MA 100 (dessicateur infra rouge) ▪ Etuve ventilée | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Spatule en inox ▪ Bêchers en plastique ▪ Cristallisoirs en inox ▪ Portoirs ▪ Coupelles en aluminium |

➤ Réactifs

- NaOH à 0.1 N ;
- La solution Alcalimétrique (Acide sulfurique H₂SO₄) à 1.82 g/l ;
- Phénolphtaléine ;
- Alcool iso amylique ;
- Solution de phosphate mono potassique (dihydrogénophosphate de potassium) : 6.81 g/100 ml d'eau distillée ;

- Solution standard d'EDTA ;
- Solution tampon k10 ;
- Indicateur noir ériochrome T ;
- Liqueur argentimétrique (AgNO₃) N/50 ;
- Indicateur pour chlorures.

II.1.2. Analyse microbiologique en appliquant la méthode classique

➤ Matériel

| Verreries | Appareillages | Outils |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Flacons stériles (Simax) ▪ Tubes à essais stériles ▪ Lames ▪ Lamelles ▪ Pipettes Pasteur ▪ Béchers ▪ Pipettes stériles (Germany). ▪ Cloches de Durham. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Autoclave (Matachana). ▪ Bec bunsen. ▪ Microscope optique (Roundfin) ▪ Bain-marie (STUART). ▪ Etuves réglées à 30°C, 37°C et à 46°C (JOUAN). ▪ Minuterie. ▪ Balance analytique. (Denver Instrument Mxx-2001) ▪ Hotte (Airstream) ▪ pH-mètre | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Boites de pétrie. ▪ Seringues. ▪ Portoirs |

➤ Milieux de culture et réactifs

| Milieux solides | Milieux liquides | Réactifs / Colorants |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Gélose PCA. ▪ Gélose Hektoen. ▪ Milieu Viande foie (VF). ▪ Milieu BCPL. ▪ Milieu Rothe | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Eau peptonée tamponnée ▪ Bouillon Muller Kauffmann. ▪ Eau physiologique. ▪ Liquide Ringer. ▪ Bouillon lactosé au vert brillant et à la bile (BLBVB). ▪ Milieu Litsky | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Violet de gentiane. ▪ Lugol. ▪ Alcool. ▪ Fuchsine. |

La composition des milieux de culture utilisés est citée en annexe I

II.1.3. Cytométrie en flux

➤ Matériel

- D-count 50 (Référence 414393 et 414394) (bioMérieux) (figure N° 05)



Figure N° 05 : D-count 50 - Cytomètre de type CHEMUNEX (bioMérieux)

- Agitateur de type vortex.
- Portoir de tubes.
- Pipettes stériles graduées de 1 ml.
- Réfrigérateur 2-8°C.
- Tubes stériles de 20 ml.
- Fer à souder.

➤ Réactifs

| Nom commercial | Fonctions |
|-----------------------|---|
| Chemsol B24 | Tampon de marquage. |
| Chemchrome V26 | Réactif de marquage |
| CS26A | Réactif utilisé pour masquer les particules auto fluorescentes et valider les analyses. |
| CS26B | Réactif utilisé pour optimiser l'étape de marquage. |
| CSR | Ce réactif est dissout dans le diluant II juste avant l'utilisation. Le mélange de ces réactifs est utilisé comme solution réductrice de la fluorescéine libre. |

| | |
|-------------------|--|
| Diluant II | Réactif utilisé pour dissoudre le CSR. |
| Isored | Réactif utilisé pour empêcher l'oxydation de la solution réductrice. |
| Cleaning 5 | Solution de nettoyage utilisée pour nettoyer les puits d'injection et la cellule de mesure entre chaque analyse. |
| Chemsol S | Ce réactif a une double fonction : l'une comme liquide de gaine qui permet d'obtenir le flux laminaire nécessaire pour l'analyse et l'autre comme solution de rinçage. |
| Antifoam | Anti mousse. |
| Cleaning 3 | Solution de nettoyage utilisée pour le nettoyage quotidien et hebdomadaire du système. |
| Standard G | Réactif utilisé pour la calibration quotidienne de l'analyseur. |

II.2. Echantillonnage

L'échantillonnage est un point clef pour l'obtention de résultats valides. Sa bonne mise en œuvre permet d'obtenir une bonne représentativité de l'échantillon prélevé (Pointurier, 2003).

Avant d'effectuer toute analyse, il convient de procéder à une série d'opérations très importantes dont dépend en grande partie la qualité des résultats. Pour se faire, il faut choisir des échantillons de volume suffisant et représentatif, définir le lieu et les conditions de prélèvement et les acheminer dans les bonnes conditions au laboratoire d'analyse.

II.2.1. Poudre de lait

Avant de procéder à l'échantillonnage, la vérification concernant l'étiquetage des sacs est effectuée. La poudre de lait doit répondre aux mentions réglementaires (l'article 10 conformément aux dispositions du décret exécutif n° 90-367 du 10 novembre 1990) (JORA N° 80, 1999).

L'échantillonnage de la poudre de lait (à 26% et à 0% de MG) est réalisé en suivant ces étapes : une dizaine de sacs de 50 kg sont réparties en plusieurs lots. Deux lots ont été sélectionnés aléatoirement pour les prélèvements.

Ces prélèvements ont été réalisés initialement au niveau du magasin de la matière première, Les sacs en papier ont été ouverts à côté du flambeau à l'aide des ciseaux désinfectés à l'alcool à 70 %. Une pelle en inox stérilisée a été plongée au fond du sac afin de prélever 250 g de poudre pour chaque type. Les poudres prélevées ont été versées dans des sacs en plastique appropriés préalablement étiquetés. Les sacs en plastique et en papier ont été fermés pour éviter toute contamination issue de l'air.

Les prélèvements effectués ont été acheminés au laboratoire afin de réaliser les analyses physicochimiques et bactériologiques.

II.2.2. Eau de procès

L'échantillonnage a été réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Il s'agit d'une surveillance de l'eau brute et traitée destinée au processus de fabrication dans l'industrie afin d'effectuer les analyses physicochimiques et microbiologiques.

Le robinet de prélèvement d'eau a été flambé. On laisse l'eau couler un moment, et on prélève par la suite des échantillons de 250 ml dans des flacons en verre stérilisés et étiquetés

II.2.3. Produit fini

Pour suivre la qualité microbiologique du lait UHT (produit fini), un prélèvement de 40 briques a été effectué à différents stades de production du même lot : au début de production, au cours du conditionnement (à 25 %, à 50 % et à 75 %) et à la fin du conditionnement. Les prélèvements sont réalisés dans les mêmes conditions et suivant la même ligne de production.

- Dix briques ont été utilisées pour la réalisation des analyses bactériologiques selon la méthode classique ainsi que les analyses physicochimiques ;
- Dix briques ont été utilisées pour la réalisation des analyses bactériologiques par cytométrie en flux ;
- Vingt briques ont été utilisées pour la réalisation de l'épreuve de stabilité.

➤ Microbiologie classique

Les dispositions réglementaires (**JORA N°35, 1998**) fixent le nombre d'échantillons à prélever à 5 unités par lot.

Dans notre étude, chaque unité est représentée par une brique de lait (1 échantillon = 5 unités = 5 briques). Par conséquent, dix briques ont été retirées pour chaque production. Ces échantillons ont été prélevés au début de la chaîne de production, au cours de conditionnement (à 25 %, à 50 %, à 75 %) et à la fin du conditionnement.

➤ **Cytométrie en flux**

Deux échantillons (chacun est représenté par 05 unités ou 05 briques) ont été prélevés à différentes stades de production. Ces briques sont ensuite numérotées suivant l'ordre de conditionnement. Les échantillons ont été étiquetés et transférés à la salle d'étuvage à température de 30 °C pendant 24 heures minimum pour les laits stérilisé UHT.

➤ **Epreuve de stabilité**

A la fin de production, quatre échantillons (20 briques) du lait UHT du même lot ont été incubés à différentes températures afin de réaliser les analyses bactériologiques et physicochimiques :

- Dix briques ont été étuvées à 30°C pendant 14 jours ;
- Cinq briques ont été étuvées à 55°C pendant 7 jours ;
- Cinq briques témoins ont été étuvés pendant 15 jours à température ambiante.

Des analyses physico-chimiques, sensorielles et microbiologiques ont été effectuées à la fin de la période d'étuvage.

II.3. Méthodes d'analyses

II.3.1. Analyses sensorielles et physicochimiques

Les analyses sensorielles et physicochimiques peuvent nous renseigner sur la qualité microbiologique du lait. Une odeur de rance ou bien un goût acide à titre d'exemple peuvent indiquer une contamination et/ou une multiplication des microorganismes.

a. Analyses sensorielles

Les analyses réalisées sont résumées dans le tableau IX.

Tableau IX : Analyses sensorielles effectuées pour la matière première et le produit fini

| Produits | Paramètres | Méthodes | Normes |
|--|---------------------|--|-----------------------------------|
| Poudre de lait (Normes selon les BPF appliquées en interne) | - Aspect et couleur | - L'appréciation est faite visuellement - La couleur doit être, blanchâtre pour la poudre de lait à 0% de MG et jaunâtre celle à 26% de MG ; sans grumeaux pour les deux types de poudre. | Aspect normal Couleur jaunâtre |
| | - Goût et odeur | - Réalisation d'un test olfactif et gustatif - Le goût et l'odeur doivent être francs, sans odeur de cuit ou étrange à celle du lait | Normal |
| Eau de procès | - Couleur | - L'appréciation est faite visuellement | Clair limpide |

| | | | |
|--|---------------------------------|---|---------|
| Norme (JORA N° 18, 2011) | | - Incolore | |
| | - Goût et odeur | - Réalisation d'un test olfactif et gustatif - Non désagréable | Normal |
| Produit fini (avant étuvage et après étuvage) | - Couleur | - L'appréciation est faite visuellement - La couleur doit être blanche | Blanche |
| | - Goût et odeur | - Réalisation d'un test olfactif et gustatif - Le goût et l'odeur doivent être typique du lait | Normal |
| Norme (JORA N° 35, 1998) | - Remontée de la matière grasse | - L'appréciation est faite visuellement à l'ouverture de la brique. | Absence |
| | - Sédimentation des protéines | - L'appréciation est faite visuellement après avoir vidé la brique. | |

b. Analyses physicochimiques

Les différentes analyses effectuées sont résumées dans le tableau X.

Tableau X : Analyse physicochimiques effectuées sur la matière première et le produit fini.

| | Eau de procès | | Poudre du lait à 0 et à 26 % de MG | | Lait stérilisé UHT | | | | |
|---------------------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|-------------|--------------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| | | | | | Avant étuvage | | Après étuvage | | |
| | Test réalisé | Norme (JORA N° 18, 2011) | Test réalisé | Norme (BPF) | | Test réalisé | Norme (JORA N° 35, 1998) | Test réalisé | Norme (JORA N° 35, 1998) |
| 26 % | | | | 0 % | | | | | |
| pH | ✓ | $\geq 6,5 \leq 9$ | ✓ | 6.4 – 6.7 | | ✓ | 6,6 -6,8 | ✓ | 6,6 - 6,8 |
| Titre alcalimétrique (TA) | ✓ | 200 mg/l en CaCo3 | / | / | | / | / | / | / |
| Conductivité | ✓ | 2800 μ S/ cm | / | / | | / | / | / | / |
| Chlorure (Cl) | ✓ | 500 mg/l | / | / | | / | / | / | / |
| Dureté (TH) | ✓ | 500 mg/l en CaCo3 | / | / | | / | / | / | / |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---------|---|-----------|------------|-----------|---|
| Acidité titrable (AC) | / | / | ✓ | < 14 | ✓ | 12 - 15 | ✓ | 12 - 15 | |
| Extrait sec total (EST) | / | / | ✓ | 95 – 97 | ✓ | 10.7–10.8 | ✓ | 10.7–10.8 | |
| Test de stabilité à l'alcool | / | / | / | / | ✓ | Négatif | ✓ | Négatif | |
| Test de stabilité à la chaleur | / | / | / | / | ✓ | Négatif | ✓ | Négatif | |
| Taux d'humidité (H) | / | / | ✓ | ≤ 4 | / | / | / | / | |
| Taux de protéines | / | / | ✓ | 25 – 35 | / | / | / | / | |
| Matière grasse (MG) | / | / | ✓ | 26 | 0 | ✓ | 15,5 -16,5 | / | / |
| Densité | / | / | / | / | / | ✓ | 1,03-1,033 | / | / |

✓ : Paramètre à analyser

1) Matière première

• La poudre de lait

Les analyses physicochimiques effectuées sur la poudre de lait (à 0 % ou à 26 % de la matière grasse) sont illustrées dans le tableau suivant :

| Paramètres | Normes |
|-------------------------|-----------------------|
| pH | 6.4 - 6.7 |
| Acidité titrable (AC) | < 14 |
| Extrait sec total (EST) | 95 - 97% |
| Taux d'humidité (H) | ≤ 4% |
| Taux de protéines | 25 – 35% |
| Matière grasse (MG) | 26% au min au bien 0% |

🔍 Détermination du pH

✓ Principe

pH (potentiel hydrogène) représente la mesure de l'alcalinité en chimie. Le pH mesure la concentration d'une solution aqueuse en ions oxonium H_3O^+ et le degré d'acidité ou de basicité d'une solution.

✓ Mode opératoire

- Le pH-mètre a été étalonné à l'aide des deux solutions tampons ;
- L'électrode a été introduit dans le bécher contenant la poudre de lait reconstitué à analyser ;
- A chaque détermination du pH, l'électrode a été retirée et rincé avec l'eau distillée et séché.

🔍 Dosage de l'acidité titrable

✓ Principe

La mesure de l'acidité titrable du lait consiste à la mesure de la quantité de l'acide lactique contenue dans un litre de lait. Elle est exprimée en degré Dornic. Un degré Dornic est équivalent à 0.1g d'acide lactique par litre de lait.

Ce dosage est basé sur un titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium NaOH (0.1 N) en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré.

✓ Mode opératoire

1. Préparation du lait reconstitué

- Dans un bécher, dix grammes de la poudre de lait ont été dissoutes dans 50 ml d'eau distillée.
- La solution obtenue a été bien homogénéisée.
- Le contenu du bécher a été titré par addition, de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 mol/l, à l'aide de la burette, jusqu'à obtention d'une faible couleur rose semblable à celle du témoin de couleur
- La durée du titrage ne doit pas dépasser 45 secondes ;
- Le volume de NaOH utilisé pour le titrage a été noté.

✓ Expression des résultats

- L'acidité titrable est égale à : $2 \cdot V$

Où : V : est le volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé pour le titrage.

🔗 **Mesure de l'extrait sec total**

✓ **Principe**

L'appareil de séchage comporte deux cylindres rapprochés, chauffés intérieurement par de la vapeur (130-150°C) et tournant lentement en sens inverse. Le lait tombe entre deux cylindres et se répartit uniformément sur leur surface.

La dessiccation est rapide, le lait formant un film qui est détaché par un couteau racleur. La vapeur d'eau formée est aspirée par une hotte placée au-dessus des cylindres.

✓ **Mode opératoire**

- L'analyseur d'humidité a été mis sous tension ;
- Le programme et l'affichage du programme ont été sélectionnés puis ce programme a été chargé et confirmé ;
- L'échantillon a été apporté à température ambiante et bien homogénéisé ;
- La chambre à échantillon a été ouverte puis une nouvelle coupelle a été posée ;
- La coupelle a été tarée ;
- Environ 4 g de l'échantillon a été réparti sur la coupelle jusqu'à l'affichage d'une mention « démarrer analyse » ;
- La chambre a été fermée et le programme de dessiccation a été démarré ;
- La dessiccation a été arrêtée automatiquement lorsqu'aucune perte de poids n'est plus détectable ;
- Ensuite l'extrait sec obtenu a été affiché, il est exprimé en pourcentage en masse.

🔗 **Détermination du taux d'humidité**

C'est la quantité de l'eau dans la poudre de lait, elle est déterminée par séchage de la poudre de lait par un dessiccateur muni d'un système électronique (Infrarouge) permettant de calculer le taux de matière sèche restante.

✓ **Mode opératoire**

- A l'aide du dessiccateur une coupelle a été pesée puis tarée.
- Cinq grammes de la poudre de lait ont été ajoutés et étalés sur la coupelle
- la coupelle a été remise sur l'appareil.
- La fin d'évaporation se manifeste lorsque la perte de poids reste constante.

✓ **Expression des résultats**

- Le dessiccateur indique directement en pourcentage le taux d'humidité sur l'écran. Le taux d'humidité doit être compris entre 1 et 4%.

✎ Détermination du taux de protéines et le taux de matière grasse

Le Milkoscan est un appareil automatique d'analyse du lait par spectrophotométrie.

Il permet de déterminer la teneur en matière grasse et en protéines.

✓ Mode opératoire

- Le contenu du sac de poudre de lait a été homogénéisé par des retournements ;
- Une solution à 10 % (20 g de poudre de lait ont été pesés et on leur ajoute 180 ml d'eau distillée) ; La solution a été
- chauffée au bain marie à 40°C pendant 5 minutes ;
- homogénéisée à l'aide du mixeur pendant 2 minutes ;
- chauffée une deuxième fois à 40°C ;
- analysée avec le FT 120 en utilisant le programme lait cru ;
- Les valeurs correspondantes aux taux de matière grasse et taux de protéines ont été relevées.

✓ Expression des résultats

- Le résultat final a été directement lu sur le cadran du Milkoscan, il est exprimé en pourcentage massique (g/100ml) ;
- Le résultat obtenu est multiplié par 10 pour l'exprimer en gramme par litre (g/l).

• L'eau de procès

Les analyses physico-chimiques effectuées sur l'eau de procès sont illustrées dans le tableau suivant :

| Paramètres | Norme (JORA N° 18, 2011) |
|---------------------------|--------------------------|
| pH | $\geq 6,5 \leq 9$ |
| Titre alcalimétrique (TA) | 200 mg/l en CaCo3 |
| Conductivité | 2800 μ S/ cm |
| Dureté (TH) | 500 mg/l en CaCo3 |
| Chlorure (Cl) | 500 mg/l |

✎ Titre hydrométrique (TH)

✓ Principe

La dureté totale est la somme des concentrations des ions calcium et magnésium dans l'eau, exprimés en carbonate de calcium. Le dosage de la dureté totale est effectué par la méthode titrimétrique à l'EDTA.

✓ Mode opératoire

- L'échantillon a été agité vigoureusement ;
- Vingt-cinq millilitres de l'échantillon de l'eau à analyser ont été versés dans l'erenmeyer de 250 ml ;
- Une dizaine de gouttes de solution tampon k10 ont été ajoutées et agitées ;
- Quatre gouttes de l'indicateur noir ériochrome T ont été versées et agitées ;
- En présence des ions calcium et magnésium la solution sera violette. Si la solution devient bleue donc TH= 0°f ;
- Cette solution a été titrée avec l'EDTA en remuant continuellement jusqu'à disparition de la couleur pourpre jaunâtre et l'apparition de la couleur bleue (fin du titrage) ;
- Le volume d'EDTA utilisé (ml) a été noté.

✓ Expression des résultats

- Les résultats sont exprimés en °F ;
- La concentration en TH est égale à : 4 x le volume d'EDTA utilisé (ml).

✎ Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

La détermination du pH s'effectue par mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de mesure (électrode en verre) et une électrode de référence (**Ourtelli et Brahimi, 2012**).

✓ Mode opératoire

- Le pH a été étalonné à l'aide des deux solutions tampons.
- L'électrode a été plongée dans l'eau à analyser et la valeur du pH a été lue.
- A chaque détermination du pH, l'électrode a été retirée et rincée avec l'eau distillée puis a été séchée.

✎ Titre alcalimétrique simple (TA)

La mesure de l'alcalinité de l'eau est basée sur la neutralisation d'un certain volume d'eau par un acide minéral, en présence d'un indicateur coloré (**Hakmi, 2006**).

✓ Mode opératoire

- L'échantillon a été agité vigoureusement ;
- Vingt-cinq millilitres d'échantillon de l'eau à analyser ont été pris puis ont été versés dans un erlenmeyer de 250 ml ;

✓ Dosage du TA

- Quelques gouttes de Phénolphtaléine ont été ajoutées
- Si la solution devient rose le $\text{pH} > 8.3$, si la solution reste incolore ($\text{TA} = 0^\circ\text{f}$ $\text{pH} < 8.3$)
- Sous agitation constante, cette solution a été titrée avec la solution alcalimétrique (H_2SO_4) jusqu'à décoloration complète de la solution (couleur blanc) ;
- Le volume (V_1) a été noté en ml de la solution alcalimétrique versé.

✓ Expression des résultats

- Les résultats sont exprimés en $^\circ\text{F}$;
- La concentration en TA est égale à : $4(V_1)$ le volume de la solution alcalimétrique utilisé (ml) ;
- Pour le TA $1^\circ\text{F} = 6 \text{ mg/l}$.

✎ Dosage de chlorures [CL]

Les chlorures sont dosés par solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge brique caractéristique du chromate d'argent (**Hakmi, 2006**).

✓ Mode opératoire

- L'analyse a été faite à la suite du dosage de l'alcalinité TA sur le même échantillon ;
- Quelques gouttes d'indicateur pour chlorure ont été ajoutées, la solution devient jaune ;
- Cette solution a été titrée goutte à goutte avec la liqueur argentimétrique N/50 présente dans la pipette de 10 ml munie de la pro pipette jusqu'à l'apparition d'une teinte rougeâtre persistante (précipité rouge brique) ;
- Soit N le nombre de ml de liqueur argentimétrique versé pour l'obtention de cette coloration.

✓ Expression des résultats

- Les résultats sont exprimés en $^\circ\text{F}$;
- La concentration en chlorures (exprimé en $^\circ\text{f}$) est égale à : 4N ;
- $1^\circ = 7,1 \text{ mg/l}$.

🔍 Détermination de la conductivité électrique

✓ Principe

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement.

La mesure de conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau.

La conductivité est également en fonction de la température de l'eau, elle est plus importante lorsque la température augmente (**Manceur et Djaballah, 2016**).

✓ Mode opératoire

La mesure de la conductivité a été effectuée de l'aide d'un conductimètre.

✓ Expression des résultats

Les résultats de mesure doivent donc être présentés en termes de conductivité équivalente à 20 ou 25°C.

2) Produit fini

Les analyses physicochimiques effectuées sur le produit fini sont illustrées dans le tableau suivant :

| Paramètres | Normes |
|--------------------------------|-------------|
| pH | 6.6 - 6.8 |
| Acidité titrable (AC) | 12 – 15 |
| Extrait sec total (EST) | 10.7 - 10.8 |
| Test de stabilité à l'alcool | Négatif |
| Test de stabilité à la chaleur | Négatif |
| Matière grasse (MG) | 15.5 - 16.5 |
| Densité | 1.03- 1.033 |

🔍 Le potentiel d'hydrogène (pH)

Il nous renseigne sur l'état de la fraîcheur du lait. Sous l'action des bactéries lactiques une partie du lactose sera dégradé en acide lactique ce qui entraîne une augmentation de la concentration en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH (**Luquet, 1985**).

✓ Mode opératoire

Le pH a été déterminé directement en utilisant un pH mètre et ce après avoir plongé l'électrode dans un bécher contenant l'échantillon du lait à analyser.

✎ **Extrait sec totale (EST)**

On entend par matière sèche du lait le produit résultant de la dessiccation du lait dans les conditions décrites par la norme **AFNOR de 1985**.

Elle est déterminée par le Milkoscan.

✎ **Détermination du taux de matière grasse (MG)**

✓ **Principe**

Méthode acido-butyrique de GERBER. Cette détermination est basé sur l'ajout de l'acide sulfurique qui dissout les protéines du lait, la séparation de la matière grasse des autres constituants est réalisé après centrifugation du butyromètre en présence d'alcool iso-amylique. (**Jeantet *et al.*, 2008**)

✓ **Mode opératoire**

- A l'aide d'une pipette ou d'un système automatique, 10 ml d'acide sulfurique ont été mesurés et ont été introduit dans le butyromètre
- Dix millilitres du lait ont été ajoutés en mettant la pointe de la pipette en contact avec la base du col du butyromètre, et laissant le lait couler doucement
- Un millilitre d'alcool amylique a été apporté puis déposé à la surface sans mouiller le col du butyromètre ni mélanger les liquides.
- Le butyromètre a été bouché avec un bouchon en caoutchouc sec et en bon état sans perturber son contenu.
- Le butyromètre a été agité et retourné jusqu'à ce que son contenu soit complètement mélangé et homogène.
- Ce butyromètre a été mis au bain marie pendant 5 min à haute température, pour éviter le refroidissement pendant les retournements puis centrifugé pendant 5 min à 1000-1200 tours/min puis chauffé une seconde fois au bain marie pendant 5 minutes,
- La lecture a été effectuée.

✓ **Expression des résultats**

- Le butyromètre a été enlevé du bain d'eau en maintenant le bouchon vers le bas et a été ajusté devant le repère le plus proche.
- Le trait de repère correspondant à l'extrémité inférieure de la colonne de matière grasse a été noté.
- Le trait de repère au haut de la colonne de matière grasse coïncidant avec le point le plus bas du ménisque du Butyromètre a été noté.

$$\text{MG (g/l)} = (\text{B}-\text{A}) \times 100$$

A : la valeur correspondant au niveau inférieur de la colonne grasse.

B : la valeur correspondant au niveau supérieur de la colonne grasse.

🔗 **Les tests de stabilités**

La stabilité est l'aptitude du lait à subir un traitement thermique sans coagulation ni floculation.

➤ **Test à l'alcool**

Il consiste à mélanger dans un tube, le lait et l'alcool éthylique à 80 % examiner la présence ou l'absence d'une floculation. Le test est dit négatif si on ne constate aucune floculation pendant au moins une minute (**JORA N°43, 2004**).

✓ **Mode opératoire (JORA, 2004)**

- Deux millilitres du lait à examiner ont été introduit dans un tube à essai ;
- Un même volume d'alcool éthylique a été ajouté, puis le tube a été fermé ;
- Le tube a été tourné deux à trois fois sans agitation.

✓ **Expression des résultats**

L'écoulement du mélange le long des parois du tube, sans laisser de traces de grumeaux, indique que le lait est de bonne qualité, et l'apparition des grumeaux le long des parois du tube, indique que ce lait est non conforme.

🔗 **La densité**

La densité est déterminée par un lactodensimètre muni d'une tige graduée.

Elle correspond au rapport massique à 20 C d'un même volume d'eau et de lait (**Luquet, 1985**).

✓ **Mode opératoire (Document de l'entreprise)**

- L'éprouvette a été rincée avec de lait à analyser ;
- Le lait a été versé à 20°C dans l'éprouvette ; tenue inclinée afin d'éviter la formation de mousse ou de bulles d'air.
- Le lactodensimètre a été plongé doucement dans le lait en le maintenant dans l'axe de l'éprouvette est en le retenant dans sa descente jusqu'au voisinage de sa position d'équilibre.
- L'introduction de lactodensimètre dans l'éprouvette pleine de lait doit provoquer un débordement de liquide pour éventuellement débarrasser la surface du lait des traces de mousse qui gênaient la lecture
- Trente secondes à une minute ont été attendues avant d'effectuer la lecture de la graduation.

✓ Expression des résultats

Après stabilisation du lactodensimètre, la graduation apparente au niveau supérieur de la tige a été lue. La densité a été calculée selon la formule suivante :

$$D=1+ (L \times 10^{-3})$$

D : densité du produit.

L : valeur indiquée sur la tige.

✎ Détermination de l'acidité titrable en °D

C'est le titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine comme indicateur. L'acidité titrable du lait est exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lait (AFNOR, 1985).

✓ Mode opératoire

- Dix millilitres d'échantillon à analyser ont été introduit dans un bécher auxquels 2 à 3 gouttes de l'indicateur coloré ont été ajouté ;
- Cette préparation a été titrée avec la solution NaOH (N/9) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose.

✓ Expression des résultats

$$AT= V \times 10 (D^\circ)$$

AT : Acidité titrable

V : est le volume en ml de la solution d'hydroxyde de sodium utilisé pour le titrage

II.3.2. Analyses microbiologiques

Deux méthodes d'analyse ont été mises en œuvre :

- ✓ La méthode classique ;
- ✓ La cytométrie en flux.

II.3.2.1. Méthode classique**a. Analyses microbiologiques de la poudre de lait**

Les analyses microbiologiques de la poudre de lait consiste en la recherche et /ou dénombrement d'un certain nombre de microorganismes susceptibles d'être présents dans ce produit.

Les analyses effectuées sont représentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Germes recherchées dans la poudre de lait

| Produit | Germes et résidus recherchés | Norme (JORA N°19, 2000) |
|----------------|--|--------------------------|
| Poudre de lait | Recherche de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) à 30°C | 2.10 ⁵ UFC/ml |
| | Coliformes totaux à 30°C | 1/0,1ml |
| | Salmonella | Absence/30g |
| | Germes anaérobies sulfito-réducteurs (<i>Clostridium</i>) à 44°C | Absence |
| | Antibiotiques | Absence |

Le protocole d'analyse de la poudre de lait à 0% de MG et celle à 26% est le même.

Préparation de la suspension mère et les dilutions décimales

Afin de préparer la suspension mère, 10 g de poudre de lait ont été prélevées en respectant les conditions d'asepsie puis ont été déposées dans un flacon approprié bouché préalablement stérilisé contenant 90 ml de la **solution de Ringer**, cette suspension correspond à la dilution 10⁻¹.

Pour obtenir la dilution 10⁻², 1 ml de la suspension mère ont été transférés aseptiquement dans un tube contenant 9 ml de diluant peptone sel (ou bien l'eau physiologique).

Le même protocole a été suivi pour l'obtention des différentes dilutions.

Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

✓ **Définition**

La flore mésophile aérobie totale est l'ensemble des micro-organismes aptes à se multiplier en aérobiose, aux températures moyennes, plus précisément ceux dont la température optimale de croissance est située entre 25 et 40°C. Ils peuvent être des micro-organismes pathogènes ou d'altération (**Bougeois et Leveau, 1996**).

✓ **Principe**

Le dénombrement de la flore totale est réalisé après ensemencement en masse du produit à analyser sur milieu de dénombrement non sélectif PCA (Plate Count Agar), suivi d'une incubation à 30°C pendant 72 ± 2 heures.

✓ **Mode opératoire**

- Devant le bec bensen, deux boîtes de Pétri ont étéensemencées avec 1 ml pour chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) ;
- Les boîtesensemencées ont été coulées avec la gélose PCA (environ 15 ml) fondue au préalable, refroidie et maintenue à 44-46°C ;
- Des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » ont été réalisés pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose ;
- Une boîte témoin a été coulée avec 15 ml de la gélose PCA.
- Après la solidification complète, la surface du milieuensemencée a été coulée avec 4 ml de la gélose PCA.
- Les boîtes préparées ont été retournées et incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 ± 2 heures.

✓ **Lecture et expression des résultats**

- La lecture se fait par le comptage des colonies qui apparaissent sous forme lenticulaires de couleur blanchâtre et de petite taille, d'un diamètre de 0,5 mm sur les boîtes, sachant que le nombre de colonies comptées est entre 30 et 300 colonies en raison d'un risque d'erreur. Pour calculer le nombre de colonies on utilise la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{v (n1 + 0,1 n2) .d}$$

N : nombre de germes par millilitre de produit en UFC.

ΣC : La somme de colonies comptées dans toutes les boîtes retenues.

n1 : nombre de boîtes comptées à la première dilution.

n2 : nombre de boîtes comptées à la deuxième dilution.

v : volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

d : la première dilution positive.

✚ **Recherche et dénombrement des coliformes totaux sur milieu liquide**

✓ **Définition**

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant le lactose (avec dégagement gazeux) à 30°C. Les bactéries correspondantes appartiennent - entre autres- aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

Les coliformes sont recherchés dans les aliments car ils sont de bons marqueurs de l'hygiène (**Joffin, 1999**).

✓ **Principe**

Les Coliformes se caractérisent par leur aptitude à fermenter le lactose. Le dénombrement est réalisé sur milieu liquide BLBVB contenant une cloche du Durham.

✓ **Mode opératoire**

- Devant un bec bensen, trois tubes de milieu de BLBVB ont étéensemencés avec 1 ml de la suspension mère (10^{-1}).

Les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont étéensemencées de la même manière.

- Ces opérations ont été effectuées en évitant d'introduire des bulles d'air dans les cloches du Durham.
- Les tubesensemencés ont été incubés à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 ± 2 heures.

✓ **Lecture et expression des résultats**

- La croissance et la multiplication des germes recherchés se traduit par la fermentation du lactose et l'apparition d'un trouble associé à une production d'un gaz dans les cloches de Durham (volume au minimum égal au 1/10ème du volume de la cloche) en moins de 48 heures. Elle indique la présence de coliformes.
- Le résultat est exprimé par le nombre le plus probable (NPP) de coliformes contenus dans un gramme de produit.

Tableau de Mac Grady de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP est citée en **annexe III**

✚ **Recherche des Salmonelles**

✓ **Définition**

Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif, appartenant à la famille des Entérobactéries (Oxydase négative, non sporulé, mobile le plus souvent par ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatif, fermentant le glucose, possédant une nitrate réductase, non exigeant). Les salmonelles pathogènes pour l'homme appartiennent toutes à la même espèce et la même sous-espèce (*Salmonella enterica subsp. enterica*). Elles se distinguent par leur sérotype basé sur la différence de leurs structures antigéniques : Antigène O et Antigène H (flagellaire) (**Bittar et al ., 2009**).

✓ **Principe**

Du fait de leur rareté, on réalise des étapes de revivification et de multiplication correspondant à un enrichissement voire un pré enrichissement de cellules. Ces opérations sont suivies d'isolements sur divers milieux gélosés sélectifs.

✓ **Mode opératoire**

1. Pré-enrichissement non sélectif

- Un échantillon de « Poudre de lait » de 25g a été prélevé avec une sonde stérile, ensuite a été mélangé avec 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) dans un flacon stérile ;
- La solution a été incubée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 ± 2 heures.

2. Enrichissement sélectif

- A l'aide d'une pipette stérile, 0.1 ml de culture pré-enrichit a été prélevé.
- L'échantillon prélevé a été introduit dans un tube contenant 10 ml de **bouillon Muller Kauffmann**.
- Le tube a été incubé à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures.

3. Isolement

- A l'aide d'une pipette pasteur stérile, 0.1 ml de culture **Muller Kauffmann** a été ensemencé sur une gélose **Hektoen** par la technique de stries ;
- La boîte de pétri a été incubée à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures.

✓ **Lecture et expression des résultats**

Les salmonelles présentent des colonies vertes ou bleuâtres, avec un centre noir pour la majorité des souches. Le centre noir signifie la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S^+).

La recherche de ces germes s'effectue par des tests de présence ou absence de ce dernier car la réglementation exige 0 germe par g de produit.

✚ **Recherche des *Clostridium sulfito-réducteurs* à 46°C .**

✓ **Définition**

Ce sont des bacilles Gram positif, anaérobies strictes, catalase négative, sporulés, mobiles, ils sont en général mésophiles et supportent des variations assez importantes de pH et de température. Ils sont saccharolytiques ou protéolytiques selon les espèces. Ils sont très réponsus dans la nature et ils contaminent de nombreux produits (**Guiraud, 2003**).

✓ **Principe**

La recherche des *Clostridium sulfito-réducteurs* s'effectue sur gélose viande foie additionnée de sulfite de sodium et d'alun de fer. Le sulfite est réduit en sulfure et réagit avec les ions ferriques en provoquant le noircissement des colonies des *Clostridium sulfito-réducteurs*.



✓ **Mode opératoire**

- Cinq tubes ont étéensemencés aseptiquement avec 2 ml de la suspension mère ;
- Les tubesensemencés ont été chauffés à 80°C pendant 8 à 10 minutes, ensuite ont été refroidi immédiatement sous l'eau de robinet.
- Quinze millilitres de la gélose viande foie ont été ajoutés pour chaque tube préalablement fondue et refroidie à $45 \pm 2^\circ\text{C}$;
- Un autre tube faisant office de témoin a été également préparé contenant uniquement 15 ml de la gélose viande foie ;
- Les tubes ont été laissés se solidifier sur une paillasse à température ambiante pendant 30 minutes, ensuite ont été incubés à 46°C pendant 48 heures.

✓ **Lecture et expression des résultats**

- Les *Clostridium* se développent sous forme de grosses colonies noires dues à la formation de sulfure de fer II.
- Afin d'éviter toute contrainte lors de la réalisation des lectures due aux colonies envahissantes des sulfito-réducteurs, faire une première lecture après 24 heures d'incubation et après 48 heures d'incubation, s'il y a noircissement total de la gélose, prendre en considération la lecture après 24 heures d'incubation.
- La lecture est réalisée en constatant la présence ou l'absence des germes (car la réglementation exige 0 germe par g de produit).

b. Analyses microbiologiques de l'eau

Le contrôle bactériologique réalisé dans ce contexte, porte sur la quantification des germes indicateurs de contamination fécale : les coliformes et les streptocoques fécaux. D'autres indicateurs non spécifiques ont été utilisés comme complémentaires : les germes totaux et les *Clostridium sulfito-réducteurs* (Tableau XII)

Tableau XII : Les microorganismes recherchés dans l'eau de procès.

| Produit | Germes recherchés | Normes (JORA N°35, 1998) |
|-----------------|--|--------------------------|
| L'eau de procès | Recherche de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) à 30°C | $< 10^2$ UFC/ml |
| | Coliformes totaux | < 10 UFC/ml |
| | Coliformes fécaux | Absence |
| | Streptocoques | Absence |

| | | |
|--|---|---------|
| | Germes anaérobies sulfito-réducteurs (<i>Clostridium</i>) à 44°C | Absence |
|--|---|---------|

✚ Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La numération des germes aérobies mésophiles ou germes totaux, vise à estimer la densité de la population bactérienne générale dans l'eau potable. Elle permet ainsi une appréciation globale de la salubrité générale d'une eau, sans toutefois déterminer les sources de contamination. D'une manière générale, ce dénombrement est utilisé comme indicateur de pollution et également comme indicateur d'efficacité de traitement.

✓ Mode opératoire

Le même protocole de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale utilisé pour l'analyse de la poudre de lait a été appliqué pour l'analyse de l'eau de procès.

- La seule différence réside dans la prise d'essai et la préparation de la solution mère qui représente dans ce cas l'échantillon lui-même (car le produit est liquide).

✚ Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Les Coliformes totaux sont utilisés comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale et sont cependant très utiles comme indicateurs de l'efficacité d'un traitement.

✓ Mode opératoire

La recherche des coliformes s'effectue sur un milieu non sélectif BCPL (Bouillon Lactose au Pourpre Bromocrésol) : BCPL simple concentration (S/C) et BCPL double concentration (D/C). Il permet de différencier les espèces fermentant le lactose de celles qui ne le fermentent pas.

- Une série de 9 tubes, chaque tube contient 10 ml de bouillon BCPL ont été ensemencés de la manière suivante :
 - 3 tubes (S/C) par 0,1 ml de l'échantillon.
 - 3 tubes (S/C) par 1ml de l'échantillon.
 - 3 tubes (D/C) par 10 ml de l'échantillon.
- Le gaz présent éventuellement dans les cloches a été chassé et le milieu a été bien homogénéisé ;
- Les tubes ont été incubés à l'étuve à 37 °C pendant 48 heures.

✓ Lecture 01

Seront considérés comme positif + ; les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).
- La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady NPP.

✓ **Test de confirmation**

- Le test de confirmation est basé sur la recherche de coliformes fécaux parmi lesquels on redoute surtout la présence d'*Escherichia coli*.
- A partir des tubes de BCPL positifs, quelques gouttes ont été prélevées et repiquées dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche.
- Le gaz présent éventuellement dans les cloches a été chassé.
- Les tubes repiqués ont été incubés à 44 °C pendant 24 heures.

✓ **Lecture 02**

Seront considérés comme positif + ; les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement du gaz (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche).
- Un anneau rouge ou rose en surface, témoin de la production d'Indole par *Escherichia coli* après ajout de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs.
- La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady NPP.

✚ **Recherche et dénombrement des streptocoques**

Les streptocoques fécaux sont des bactéries de Gram+ de forme oblongue ou de cocci sphériques légèrement ovales. Ils se disposent, le plus souvent, en diplocoques ou en chainettes. Ils sont des témoins de contamination fécale assez résistant, y compris dans les milieux salés. Ils peuvent aussi se multiplier dans les milieux présentant des pH allant jusqu'à 9.6, on peut par conséquent les utiliser comme indicateurs d'organismes pathogènes qui ont une résistance similaire au pH élevé (Sadi *et al.*, 2007).

✓ **Mode opératoire**

- Dans un flacon contenant 50 ml de milieu Rothe D/C, un échantillon 50 ml d'eau a été ensemencé ;
- Le flacon a été incubé à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

✓ **Lecture 01**

Sera considéré comme positif, le flacon présentant à la fois :

- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu pendant cette période est présumé contenir un streptocoque fécal.
- La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP.

✓ Test de confirmation

- Le test de confirmation est obligatoire pour approuver la présence des streptocoques fécaux.
- A partir d'un flacon de ROTHE positif, quelques gouttes ont été prélevées et repiquées dans un tube contenant le milieu LITSKY EVA :
- Le tube a été incubé à 37°C pendant 24 heures.

✓ Lecture 02

Sera considéré comme positif, le tube présentant à la fois :

- Un trouble microbien.
- Une pastille violette au fond de tube.
- La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP.

✚ Recherche et dénombrement de *Clostridium sulfito-réducteur*

En dehors des *streptocoques* fécaux et *E. coli* qui sont des indices de contamination fécale récente, du fait que leur survie dans l'eau peut être très courte, les clostridiens sulfito-réducteurs représentent l'indice d'une contamination fécale ancienne, ils sont résistants aux conditions défavorables grâce à la sporulation (Crini *et al.*, 2007).

✓ Mode opératoire**▪ Recherche de la forme sporulée par 1 ml**

Un tube de 20 ml d'eau a été porté à 80°C pendant 10 minutes au bain-marie. Après refroidissement, un échantillon de 1 ml à partir de ce dernier a étéensemencé en masse dans un tube de 20 ml du milieu gélosé VF.

▪ Recherche de la forme végétative par 20 ml

Un tube contenant 20 ml d'eau a étéensemencé en masse avec 20 ml de la gélose VF.

- Les tubes ont été incubés à 46°C pendant 48 heures.

✓ Lecture et expression des résultats

- La forme sporulée : compter les colonies noires observées dans le tube et exprimer les résultats par 1 ml de produit.
- La forme végétative : compter les colonies noires observées dans les quatre tubes et exprimer les résultats par 20 ml de produit.

c. Analyses microbiologiques de produit fini

Le lait UHT (produit fini) doit subir un contrôle de stérilité avant d'être commercialisé pour vérifier qu'il est salubre (Odet *et al.*, 1995).

✚ Examen microscopique direct : la coloration de Gram

a. Fixation du frottis

Elle a été réalisée en suivant ces étapes :

- Une goutte ou 2 gouttes de produit (lait UHT) ont été déposées sur une lame stérile ;
- La lame a été passée directement sous la flamme de bec bensen.

b. Réalisation de la coloration

- Coloration au Violet de Gentiane (Cristal violet) : la lame a été plongée pendant 1 minute dans ce colorant (toutes les bactéries sont colorées en violet), puis a été rincée à l'eau déminéralisée.
- Mordantage au Lugol : le Lugol a été étalé et laissé agir le même temps que le violet de gentiane ; puis a été rincé à l'eau déminéralisée.
Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décoloration (rapide) à l'alcool : c'est l'étape la plus importante de la coloration : l'alcool a été versé goutte à goutte, après 10 secondes, la lame a été rincée sous un filet d'eau déminéralisée.
- Contre coloration à la Fuchsine : quelques gouttes de fuchsine ont été mises sur la lame. Après 1 minute, la lame a été lavée doucement à l'eau déminéralisée, et a été séchée sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.
- La lame a été observée avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

✚ Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

Les germes recherchés dans le produit fini sont seulement la flore aérobie mésophile totale (JORA, 2004).

✓ Mode opératoire

Le même protocole de dénombrement de la FMAT appliqué pour l'analyse de la poudre de lait a été appliqué pour l'analyse du produit fini.

- La seule différence réside dans la prise d'essai et la préparation de la solution mère qui représente dans ce cas l'échantillon lui-même (car le produit est liquide).

II.3.2.2. La cytométrie en flux

C'est une technique d'analyses microbiologiques permettant de marquer, de détecter et de dénombrer les micro-organismes dans les produits industriels et de consommation, elle représente un réel progrès technologique en microbiologie rapide (Hézar *et al.*, 2007).

✓ Principe

Les échantillons sont traités avec des réactifs qui rendent fluorescents les microorganismes viables potentiellement présents. Seuls les microorganismes viables sont capables, grâce à leur système enzymatique, de cliver un substrat non fluorescent en un dérivé fluorescent et de l'accumuler dans leur cytoplasme.

Après marquage, les échantillons sont injectés dans la cellule de mesure où les microorganismes sont alignés grâce à un flux laminaire lors du passage de l'échantillon marqué devant le faisceau laser, les microorganismes viables fluorescents sont détectés individuellement au moyen de récepteurs ultrasensibles à la fluorescence.

L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées (**Reibetanz et al ., 2007**).

✓ Mode opératoire**1. Préparation de la série d'analyse**

- Les produits ont été incubés 24 heures minimum dans des conditions favorables à la croissance des microorganismes à une température $30 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$;
- Après avoir désinfecter les mains avec une solution alcoolique, 50 tubes ont été numérotés dont 02 témoins ;
- Les briques à analyser ont été homogénéisées vigoureusement ;
- Ces dernières ont été perforées à l'aide d'un fer à souder afin d'éviter toute sorte de contamination ;
 - A l'aide d'une pipette graduée, 500 μl produit fini a été prélevé à partir des briques puis a été transféré dans des tubes de 20 ml à usage unique.

2. Préparation et chargement des contrôles

- Un tube vide a été placé en première position sur le portoir d'incubation qui représente le témoin négatif ;
- Un millilitre d'une culture de levure fraîche ou d'une bactérie a été transféré dans un tube qui porte le numéro 50 et qui représente le témoin positif ;
- Les 48 tubes ont été chargés sur le portoir d'incubation qui a été préalablement réglé à une température de $30 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$.
- Les tubes chargés ne doivent pas rester plus de 20 minutes dans le portoir d'incubation avant lancement d'une le série d'analyse.

3. Nettoyage et préparation des réactifs

- Avant de lancer l'analyse du produit fini, l'appareil a été nettoyé ;
- Le flacon du Cleaning 5 a été placé dans le portoir circulaire noir côté droit du préparateur d'échantillons du D-Count ;
- Le flacon du réactif de chemchrome V26 a été placé dans le portoir réfrigéré à 3°C côté gauche du préparateur d'échantillons du D-Count ;
- La poudre de CSR a été versée dans un flacon en verre contenu le Diluant II, ensuite a été mélangée doucement jusqu'à dissolution complète de la poudre ;
- Le contenu des deux flacons CS26B et CS26A a été homogénéisé à l'aide d'un mélangeur de type vortex pendant 30 secondes ;
- Quinze gouttes d'isored ont été ajoutées à la surface de la solution CS26A+CS26B ;
- La bouteille de 2L de l'analyseur a été rempli avec du réactif Chemsol S ;
- Les tubulures de l'analyseur ont été plongées dans la bouteille de Chemsol S ;
- Quelques gouttes d'Antifoam ont été ajoutées au fond des bouteilles d'évacuation du préparateur d'échantillons ;
- Un autre nettoyage a été réalisé à la fin de l'analyse

4. Identification et analyse des échantillons

- Selon la configuration du système, l'application DC50-720-02 a été sélectionnée ;
- le nom des échantillons et les informations ont été saisies dans les colonnes correspondantes dans la table des donnés ;
- A l'aide du schéma affiché à l'écran du système D- count la position des réactifs, les échantillons et le niveau du liquide de gaine ont été vérifiés ;
- L'analyse a été exécutée ;
- Après 95 minutes, les résultats ont été présentés sur l'écran.

✓ Lecture et expression des résultats

- L'interprétation des résultats est réalisée en faisant une lecture des informations affichées sur l'écran dans la colonne « résultats » (tableau XIII).

Tableau XIII : Interprétation des résultats d'analyses bactériologiques du produit fini par la cytométrie en flux.

| Résultat du D-count® | Interprétation |
|--|--|
|  | Analyse non réalisée |
|  | Résultat négatif |
|  | Résultat positif L'échantillon analysé contient au moins un microorganisme cible avant incubation |
|  | Erreur au cours de l'analyse |
|  | Résultat validé |

- Le résultat est considéré positif s'il est supérieur à la valeur du seuil de positivité qui est fixée à 150 counts / ml qui correspondent à 10 UFC/0,1 ml et 100 UFC/1 ml (valeur validée par la norme **ISO 16040**).

II.3.2.3. Epreuve de stabilité de lait UHT

✓ Principe du contrôle de stabilité

Les laits stérilisés UHT sont parfois instables durant le stockage en brique ou lors du chauffage chez le consommateur, et peuvent devenir instable avant la date limite de consommation.

C'est dans cette optique que s'inscrit la stratégie de contrôle-établi par le JORA N°35 du 27 mai 1998 dont l'objectif de ce contrôle est d'évaluer la stabilité du lait stérilisé UHT en déterminant certains paramètres sensoriels, physico-chimiques et microbiologiques après étuvage des échantillons à 30°C pendant 14 jours et d'un étuvage à 55°C pendant 7 jours.

✚ Analyse microbiologique après étuvage

La stabilité du lait stérilisé a été mise en évidence seulement par contrôle physicochimique ainsi le contrôle bactériologique (tableau XIV) en utilisant les méthodes classiques.

Tableau XIV : les germes recherchés dans le produit fini après étuvage.

| Produit | Germes recherchés | Temps et température d'étuvage | Valeur de référence (J.O.R.A. N°35,1998) |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Produit fini après étuvage | Recherche de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) à 30°C | <ul style="list-style-type: none">- J₀ à J₁₄ (30°C)- J₁₄ à J₂₁ (55°C)- J₀ à J₁₅ (température ambiante) | < 10 UFC/0,1 ml |

Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale après l'étuvage à 55°, 30° et à température ambiante a été effectué en appliquant le même protocole que celui utilisé pour l'analyse du produit fini avant l'étuvage.

*Résultats et
discussion*

III. Résultats et discussion

III.1. Qualité des matières premières

III.1.1. La poudre de lait

a. Analyses sensorielles de la poudre de lait

▪ Goût et odeur

Le goût et l'odeur sont francs, sans odeur de cuit ou étrange à celle du lait, ce qui confirme la stabilité et la fraîcheur de la poudre.

▪ Couleur

La couleur blanchâtre de la poudre de 0% matière grasse (MG) est normale, car elle ne contient pas de MG, tandis que la couleur jaunâtre de la poudre de 26%MG indique que celle-ci contient une certaine quantité de MG.

▪ Aspect

Le résultat est conforme à la norme (aspect normal) car la poudre ne présente ni de grumeaux ni d'aspect brûlé.

Les résultats d'analyses sensorielles obtenues, montrent que la poudre analysée répond aux standards et témoignent d'une bonne application des bonnes pratiques de fabrication (entre autre la procédure d'acceptation de la matière première).

b. Analyses physico-chimiques de la poudre de lait (à 0 et à 26% de MG)

➤ Les résultats sont résumés dans le tableau XV.

Tableau XV : Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de lait (0 et 26 % de MG)

| Paramètres | MG 26 % | MG 0 % | Valeur de référence |
|---------------------------------------|---------|---------|---------------------|
| pH | 6.7 | 6.4 | 6.4 - 6.7 |
| Acidité titrable (AC) | 14 | 12 | < 14 |
| Extrait sec total (EST) | 96.39% | 95.84% | 95 - 97% |
| Test de stabilité à l'alcool | Négatif | Négatif | Négatif |
| Test de stabilité à la chaleur | 1.3 | 1.4 | 1.3 - 1.6 |

| | | | |
|----------------------------|------|------|--------------------------|
| Taux d'humidité (H) | 3.61 | 4.16 | ≤ 4% |
| Taux de protéines | 25 | 35 | 25 – 35% |
| Matière grasse (MG) | 26% | 0% | 26% au min ou bien 0% |

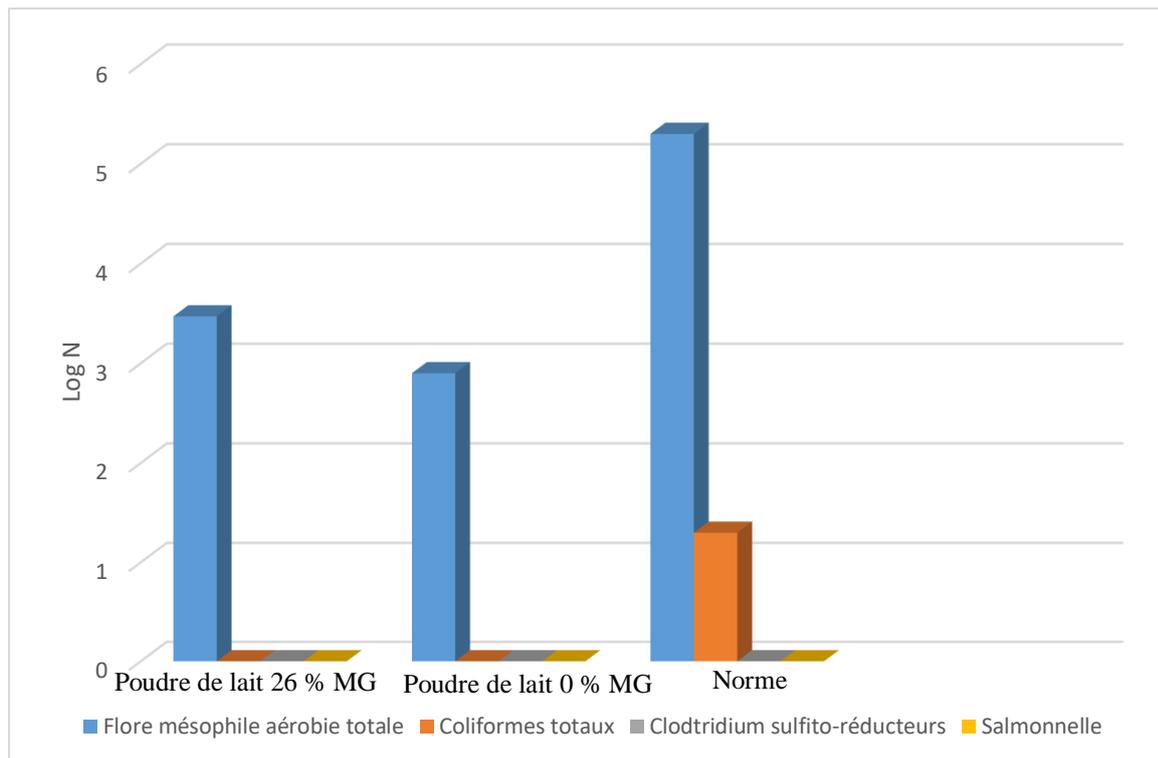
Les résultats des analyses effectuées sur les différents échantillons prélevés, nous permettent de déduire que l'ensemble des analyses physico-chimiques de la poudre de lait sont conformes aux normes.

c. Analyses microbiologiques de la poudre de lait (à 0 et 26% de MG)

- Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait (0% et 26% de MG) sont résumés dans le tableau XVI et la figure N°06.

Tableau XVI : Résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait (0% et 26% de MG).

| Germes recherchés | Poudre de lait à 26% de MG | Poudre de lait à 0% de MG | Valeurs de référence (JORA N°19, 2000) |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| FMAT | 3.10 ³ | 8.10 ² | 2.10 ⁵ UFC/ml |
| Coliformes totaux | Absence | Absence | 1/0,1ml |
| Germes anaérobies sulfito-réducteurs (Clostridium) | Absence | Absence | Absence |
| Salmonella | Absence | Absence | Absence/30g |



- N : Nombre de germes (UFC/ml)
- MG : Matière Grasse

Figure N° 06 : Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la poudre de lait (0% et 26% de MG)

Les résultats des analyses microbiologiques montrent que les échantillons de poudre de lait analysés représentent une faible charge microbienne en FMAT et une absence de germes de contamination pour les coliformes totaux, les Clostridium sulfito- réducteurs et les salmonella. Les résultats montrent que la FAMT est présente en un nombre réduit, ce qui n'a aucun impact sur la qualité microbiologique du produit car il demeure inférieur aux normes établies par le (JORA N°19, 2000).

L'absence de germes de contamination fécale (Coliformes et Clostridium sulfito-réducteurs) atteste que la poudre de lait n'a subi aucune contamination d'origine fécale, révélant ainsi le respect des conditions d'hygiène et de stockage de la poudre de lait.

Selon les travaux d'**Abdenouri et al (2008)**, le nombre réduit de germe peut s'expliquer par le faible taux d'humidité de la poudre qui ne favorise pas le développement des microorganismes, le bon conditionnement dans des emballages qui permettent d'isoler la poudre du milieu externe, ainsi que les bonnes conditions d'entreposage et de manutention qui ont permis de conserver la qualité microbiologique du produit.

Les poudres utilisées par la laiterie Soummam sont de bonne qualité. Leur conditionnement dans des sacs de 25 kg en polyéthylène doublé de sacs en papier, et leur stockage dans une salle à température ambiante permet d'éviter l'augmentation du taux d'humidité, et donc altération du produit. Le respect des bonnes pratiques d'hygiène par le personnel permet aussi d'éviter la contamination manuportée et de préserver le produit.

Les résultats obtenus montrent que la poudre de lait est stable et conforme aux normes fixées par la réglementation (**JORA N°19, 2000**).

III.1.2. L'eau de procès

a. Analyse sensorielle de l'eau de procès

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Résultats de l'analyse sensorielle de l'eau de procès

| Paramètre | Résultat | Norme |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| Gout | Normal | Normal |
| Odeur | Normale | Normale |
| Couleur | Claire limpide | Claire limpide |
| Aspect | Absence de matière en suspension | Absence de matière en suspension |

L'eau étudiée ne présente aucune odeur caractéristique, ceci indique qu'elle est dépourvue de produits chimiques et de matières organiques en décomposition, Cette eau est d'une couleur claire limpide qui ne présente pas de goût étrange.

Les résultats montrent que l'eau utilisée par laiterie Soummam répond ou exigences de la réglementation algérienne (**JORA N°18, 2011**).

b. Analyses physico-chimiques de l'eau de procès.

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII : Résultats des analyses physico-chimiques de l'eau de procès.

| Paramètres | Eau de procès | Norme (JORA N° 18, 2011) |
|---------------------------|---------------|-------------------------------|
| pH | 7,18 | $\geq 6,5 \leq 9$ |
| Titre alcalimétrique (TA) | 00 | 200 mg/l en CaCo ₃ |
| Conductivité | 1055 | 2800 μ S/ cm |
| Dureté (TH) | 40 | 500 mg/l en |

| | | |
|----------------------|-----|-------------------|
| | | CaCo ₃ |
| Chlorure (Cl) | 200 | 500 mg/l |

D'après le tableau N° XVIII, les résultats obtenus pour l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'eau de procès sont conformes aux normes algériennes, ce qui signifie que le traitement aux rayons UV d'eau appliqué par la laiterie Soummam est efficace, et l'eau utilisée pour la production du lait UHT est de bonne qualité.

c. Analyse microbiologique de l'eau de procès

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Résultats des analyses microbiologiques de l'eau de procès

| Germes | Eau de procès | Normes (JORA N°35, 1998) |
|--|---------------|--------------------------|
| FMAT | Absence | < 10 ² UFC/ml |
| Coliformes totaux | Absence | < 10 UFC/ml |
| Coliformes fécaux | Absence | Absence |
| Germes anaérobies sulfito-réducteurs (<i>Clostridium</i>) | Absence | Absence |
| Streptocoques | Absence | Absence |

Les résultats des analyses microbiologiques obtenus ont montré l'absence totale des germes aérobies, coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux, et des *Clostridium sulfito-réducteurs* responsables de la non-conformité des eaux.

Selon les travaux de **Rodier et al (2009)**, la FMAT n'est pas d'origine fécale. Elle fournit quelques informations ; comme la prolifération de la flore dans un réseau alimenté par une eau mal traitée.

De même, l'absence de spores de bactéries sulfito-réductrices constitue le témoin de l'efficacité du traitement appliqué.

L'absence des streptocoques fécaux qui sont des indices de contamination fécale résulte du respect des bonnes conditions d'hygiène (**Guiraud et Galzy, 1980**).

La conformité des résultats obtenus est due d'une part à l'efficacité du traitement aux rayons UV effectué au niveau de la station de traitement des eaux de la laiterie Soummam et d'une autre part, au respect des bonnes conditions d'hygiène.

De ce fait, l'eau de procès introduite dans le processus de fabrication du lait UHT répond aux critères réglementaires stricts exigés par le **JORA N° 18 (2011)**.

III.2. Qualité du produit fini

III.2.1. Analyses sensorielles du produit fini avant l'étuvage

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XX.

Tableau XX : Résultats d'analyses sensorielles du produit fini avant l'étuvage

| Paramètres | Couleur | Odeur | Goût | Remontée de MG | Sédiment |
|---------------|---------|--------|--------|----------------|----------|
| Avant étuvage | Blanche | Normal | Normal | Absence | Absence |

Les résultats des analyses sensorielles du produit fini montrent l'absence de toute anomalie ce qui prouve que le lait UHT produit par la laiterie Soummam est de bonne qualité, conforme aux normes fixées par la réglementation algérienne.

III.2.2. Analyses physicochimiques du produit fini

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Résultats des analyses physico-chimiques du produit fini avant l'étuvage

| Paramètres | Résultats | Normes |
|--------------------------------|-----------|-------------|
| pH | 6.6 | 6.6 - 6.8 |
| Acidité titrable (AC) | 15 | 12 – 15 |
| Extrait sec total (EST) | 10.78 | 10.7 - 10.8 |
| Test de stabilité à l'alcool | Négatif | Négatif |
| Test de stabilité à la chaleur | Négatif | Négatif |
| Matière grasse (MG) | 16.2 | 15.5 - 16.5 |
| Densité | 1.03 | 1.03- 1.033 |

Les résultats d'analyses physicochimiques obtenus ont montré que le produit analysé est conforme aux normes exigées par la réglementation Algérienne (**JORA N°35, 1998**). Ce qui confirme le respect des bonnes pratiques de fabrication.

III.2.3. Analyses bactériologiques

a. Examen microscopique direct

La caractérisation microscopique est basée sur la coloration de Gram.

Les résultats obtenus après l'observation microscopique montrent l'absence de microorganismes dans le produit fini.

Cette conformité des résultats révèle une bonne maîtrise de processus de fabrication du lait UHT, des mesures d'hygiène et une bonne maîtrise des analyses effectuées au niveau de laboratoire.

b. Analyses microbiologiques selon les méthodes classiques

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Résultats d'analyses microbiologiques du produit fini.

| Germe recherché | Produit fini | Norme (JORA N°35, 1998) |
|---------------------------------------|--------------|-------------------------|
| Flore mésophile aérobie totale | Absence | < 10 UFC/0,1ml |

Aucune colonie n'a été observée, les boîtes examinées après incubation sont identiques aux témoins. Les résultats indiquent l'absence des germes totaux dans les briques analysées ce qui traduit l'efficacité des traitements thermiques appliqués ainsi que le respect des bonnes pratiques d'hygiène.

D'après **Guiraud (1998)**, la FMAT est un bon indicateur de la stérilité et de la qualité générale des produits.

En effet comme rappelé par **Aggad et al (2010)**, les bonnes pratiques d'hygiènes et de fabrication (traitement thermique) permettent la destruction totale de la flore de contamination dans le lait stérilisé UHT.

Selon **Gandon et al (1974)**, La possibilité d'obtenir par le traitement UHT un lait dont les qualités bactériologiques et organoleptiques sont exceptionnelles devait inciter les industriels à rechercher une tunique de conditionnement aseptique permettant de lui assurer une longue conservation.

Les résultats obtenus sont conformes à la réglementation (**JORA N°35 ,1998**) pour le dénombrement de la FMAT, ce qui peut s'expliquer par le passage du produit à la stérilisation UHT à température de 140°C pendant 4 secondes, ce traitement est très efficace, il a permis la destruction totale de la flore aérobie mésophile dans le lait.

Le conditionnement aseptique et l'hygiène du matériel (circuits et tanks) en contact avec le produit contribuent aussi au maintien de sa qualité.

c. Analyses bactériologiques réalisée par la Cytométrie en flux

- Les résultats d'analyses effectuées par la Cytométrie en flux sont représentés dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Résultats des analyses effectuées sur le produit fini par la Cytométrie en flux

| Tubes | Numéro de palette | Heure de prélèvement | Date de fabrication | Counts / ml | Résultat |
|-------|-------------------|----------------------|---------------------|-------------|----------|
| 1 | T ⁻ | 11:55:45 | 03/03/2020 | 10 | Négatif |
| 2 | 05 PE stg C2 | 11:57:12 | 03/03/2020 | 10 | Négatif |
| 3 | 06 | 11:58:39 | 03/03/2020 | 30 | Négatif |
| 4 | 11 | 12:00:07 | 03/03/2020 | 30 | Négatif |
| 5 | 13 | 12:01:34 | 03/03/2020 | 10 | Négatif |
| 6 | 18 | 12:03:01 | 03/03/2020 | 10 | Négatif |
| 7 | 23 | 12:04:28 | 03/03/2020 | 10 | Négatif |
| 8 | 31 | 12:05:55 | 03/03/2020 | 00 | Négatif |
| 9 | 35 | 12:07:22 | 03/03/2020 | 130 | Négatif |
| 10 | 42 | 12:08:49 | 03/03/2020 | 20 | Négatif |
| 11 | 46 fin stg | 12:10:17 | 03/03/2020 | 30 | Négatif |
| 50 | T ⁺ | 13:06:53 | 06/03/2020 | 1038774 | Positif |

Les résultats des analyses illustrées dans le tableau, montrent que le nombre de counts pour tous les échantillons analysés de lait UHT sont inférieurs au seuil de positivité (< à 150 counts/ml) ce qui atteste de la conformité des résultats aux normes recommandées et celles appliquées par l'entreprise.

III.3. Epreuve de stabilité du lait UHT

III.3.1 Analyse sensorielle

- Les résultats de l'analyse sensorielle du lait UHT après l'étuvage (à 30 °C, à 55 °C et à une température ambiante) sont mentionnés dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV : Résultats de l'analyse sensorielle du produit fini après l'étuvage

| Paramètres | Couleur | Odeur | Gout | Remontée de MG | Sédimentation des protéines |
|--------------------------------------|---------|---------|--------|----------------|-----------------------------|
| Après étuvage à 30 °C | Blanche | Normale | Normal | Absence | Absence |
| Après étuvage à 55 °C | Blanche | Normale | Normal | Absence | Absence |
| Après étuvage à température ambiante | Blanche | Normale | Normal | Absence | Absence |

D'après les résultats, les caractéristiques sensorielles du lait UHT ne se sont pas modifiées au cours de l'étuvage à 30°C et 55°C ainsi qu'à température ambiante, cela s'explique par la stabilité du lait UHT à ces températures.

III.3.2. Résultats d'analyses physicochimiques et microbiologiques du produit fini après l'étuvage

- Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XXV et XXVI.

Tableau XXV : Résultats des analyses physico-chimiques du produit fini après étuvage

| Paramètres | Résultats | | | Norme | Valeurs avant étuvage |
|---------------------------------------|-------------|---------|---------|-----------|-----------------------|
| | T° ambiante | 30°C | 55°C | | |
| pH | 6.6 | 6.67 | 6.64 | 6,6 - 6,8 | 6.6 |
| Acidité titrable (AC) | 14 | 14 | 14.01 | 12 – 15 | 14 |
| Test de stabilité à l'alcool | Négatif | Négatif | Négatif | Négatif | Négatif |
| Test de stabilité à la chaleur | Négatif | Négatif | Négatif | Négatif | Négatif |

Tableau XXVI : Résultats des analyses microbiologiques du produit fini après étuvage

| Le germe recherché | Produit fini | Norme (JORA N°35, 1998) |
|---------------------------------------|--------------|-------------------------|
| Flore mésophile aérobie totale | Absence | <10 UFC/0,1ml |

Les résultats des analyses physico-chimiques montrent qu'il y a une stabilité au cours de l'étuvage des échantillons de lait UHT pendant 14 jours à 30°C, pendant 7 jours à 55°C et pendant 15 jours à température ambiante.

Les résultats montrent aussi l'absence totale de la FMAT dans le lait stérilisé UHT conservé à 30°C et à 55°C ainsi qu'à température ambiante, ce qui indique que le produit reste stable aux températures testées.

Cette stabilité et conformité du produit fini est atteinte grâce à l'efficacité du traitement UHT qui a permis au produit de préserver ces caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques ainsi que le respect des bonnes pratiques d'hygiène et les bonnes pratiques de fabrication.

III.4. Comparaison entre les méthodes de bactériologie classique et la cytométrie en flux

- Les méthodes utilisées (classique et alternative) présentent des caractéristiques différentes que nous pouvons résumer dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII : Comparaison entre les deux méthodes utilisées pour l'analyse microbiologique du produit fini

| Méthodes | Méthodes classiques | Cytométrie en flux |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Caractéristiques | | |
| Résultat | Lait stérile | Lait stérile |
| Durée d'incubation | 72 heures après ensemencement | 24 heures avant l'analyse |
| Spécificité | Stérile ou identification du germe | Stérile ou non stérile |
| Mode d'échantillonnage | 5 unités par lot | 25 ou 50 échantillons |
| Seuil du non stérilité | > 10 UFC/0,1ml | > 150 counts/ml |
| Analyse | Nombre de bactéries /unité de Mesure | Quantitative et qualitative |
| Libération du produit fini | Après trois jours au minimum | Après 24 heures |
| Le coût | Raisonnable | Important |

Les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyses du produit fini permettent de faire une comparaison entre ces deux techniques.

La cytométrie en flux garantit des résultats en quelques minutes, ainsi, elle permet une libération assez rapide du produit sans avoir recours à l'étape de stockage.

Parmi les avantages les plus importants de cette technique est sa grande précision car elle permet une détection précoce et une quantification des contaminants (**Reyes, 2006**).

Du point de vue économique, la préférence donnée à ces techniques plutôt qu'à la méthode classique se justifie lorsqu'on est dans l'obligation de fournir très rapidement des renseignements sur les contaminations éventuelles des produits. Néanmoins, le coût des appareillages et des réactifs peut constituer un obstacle à l'utilisation de cette technique pour analyser tous les produits fabriqués ainsi que la matière première (**Bouix et al ., 1999**).

La méthode classique quant à elle est considérée comme méthode de référence. Elle donne la possibilité d'identification des bactéries isolées en cas de contamination permettant ainsi d'identifier son origine, mais, elle nécessite beaucoup plus de temps pour aboutir aux résultats.

Adopter l'utilisation complémentaire des deux méthodes constitue la solution optimum pour rester en conformité avec la réglementation en vigueur, se renseigner dans les délais les plus réduits sur la qualité du produit (cela reste très pratique en cas d'évènements pendant la production tel que le changement de bobine de conditionnement, arrêt temporaire de la ligne de production etc...) et permet aussi de réduire le cout de stockage.

Conclusion

La présente étude a été effectuée à la laiterie Soummam. Elle a porté sur l'application de deux méthodes d'analyses microbiologiques (méthode classique et cytométrie en flux) pour tester la qualité du produit fini (lait UHT).

Le but de cette étude est de comparer les deux méthodes en mettant en avant les avantages et les inconvénients de chacune.

Des analyses physico-chimiques et bactériologiques ont été réalisées sur les matières premières utilisées pour la fabrication du lait UHT afin de s'assurer de leur qualité. Les résultats relatifs à ces analyses ont révélé la conformité des matières testées à la réglementation en vigueur. Un test de stabilité du produit fini a été aussi effectué. Les résultats ont montré que le produit reste stable sous différentes conditions et qu'il était conforme aux normes exigées par la réglementation.

L'application des méthodes classiques pour l'analyse microbiologique du lait UHT nous a permis de confirmer sa conformité aux exigences normatives. Ces méthodes nous donnent un résultat fiable mais reste très fastidieuses et nécessitent du temps pour l'obtention des résultats.

L'utilisation de la cytométrie en flux nous a permis également de s'assurer de la qualité du produit fini. C'est une méthode rapide qui nous permet d'obtenir un résultat fiable au bout de 95 min. Elle garantit la conformité des produits et permet leur commercialisation rapide, ce qui donne au fabricant l'avantage de réaliser un gain de temps et d'argent. L'appareillage nécessaire à la réalisation de cette technique reste relativement onéreux par rapport à celui employé dans les méthodes de bactériologie classique mais ça reste un investissement rentable pour les grands industriels.

Commercialiser un produit de bonne qualité reste l'objectif principal de tout industriel. La laiterie Soummam a choisi d'investir dans des équipements de haute qualité qui lui permettent de garantir la salubrité des produits commercialisés et la mise à disposition rapide du produit sur le marché afin d'assurer une disponibilité permanente de ce dernier au consommateur.

L'utilisation des techniques rapides pour l'analyse microbiologique des aliments est une excellente alternative aux méthodes classiques. En Algérie, combiner l'utilisation de ces deux méthodes d'analyses constitue une solution ingénieuse pour rester en conformité avec la législation en vigueur et assurer continuellement la conformité et la disponibilité des produits commercialisés.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abdenouri, N., Idlimam, A., & Kouhila, M. (2008).** Etude hygroskopique du lait en poudre. *Revue des énergies renouvelables, Alger*, 35-44p.
- **Aggad, H., Bridja, M., Aek, B., Benaouali, M., & Djebli, A. (2010).** Some quality aspects of pasteurized milk in Algeria. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 5(1), 21-24 p.
- **Ainseri, S., & Allou, Z. (2012).** Application de trois méthodes d'analyse Méthode classique, Test à la résazurine, Cytométrie en flux au contrôle de conformité du lait UHT produit par Tchir lait /Candia de Bejaïa. (Master II, Université Abderrahmane Mira, Bejaïa. Repéré à <http://www.univ-bejaia.dz/dspace/handle/123456789/10484>
- **Alauzet, C. (2009).** *Taxonomie des bactéries anaérobies : De la reclassification à la découverte de nouveaux pathogènes* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).
- **Amariglio, S. (1986).** *Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physiques et chimiques*. Paris : ITSV. 1030p.
- **Amiot, J., Fournie, Sebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson R. (2002).** *Composition, propriétés physiologiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait in Vignola CL. Science et technologie du lait : Transformation du lait* Quebec : Presses Internationales Polytechnique, 1-73p.
- **Andrews, W. H. (1996).** AOAC INTERNATIONAL's three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 147-151 p.
- **Anonyme (2017).** Repéré à <http://www.agrosmartcoop.eu/fr/2017/05/29/2-1-methodes-rapides-pour-le-contrôle-microbiologique-des-industries-alimentaires-typologie-1/>
- **Avezard, C.I. (1980).** *Mode de recombinaison, les laits reconstitués et leur utilisation*. Paris : Apria. 35-62 p.

B

- **Billon, P. (2009).** *Traite des vaches laitières : Matériel, installation et entretien*. Paris : Edition France Agricole.
- **Bittar, F., Caroff, N., Lanotte, P. (2019).** *Salmonella spp.* Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie (www.aemip.fr).
- **Boisard, P. (1994).** Le lait et la machine. Gillet, P. (sous la direction de). Mémoires lactées. Blanc, bu, bibliographie : le lait du monde. Ed. Autrement, Collections Mutations/Mangeurs, (143).

Références bibliographiques

- **Boubezari, M.T. (2010).** *Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel.* (Magister en médecine vétérinaire, Université Mentouri, Constantine). Repéré à <https://bu.umc.edu.dz/theses/veterinaire/BOU5589.pdf>
- **Bouix, M., & Leveau, JY. (1980).** *Les microflores responsables des transformations : les levures. In techniques d'analyses et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : le contrôle microbiologique.* Vol III. Paris : Tec & Doc. 331 p.
- **Bouix, M., Grabowski, A., Charpentier, M., Leveau, J. Y., & Duteurtre, B. (1999).** Rapid detection of microbial contamination in grape juice by flow cytometry. *International Journal of Vine and Wine Sciences.*
- **Boumendjel, M. (2005).** Conservation des Denrées Alimentaires. 60 pages.
- **Bougeois, C.M., & Leveau, J. (1996).** *Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires.* Paris : Tec et Doc, Lavoisier, 331p.
- **Bornert, G. (2000).** La place des analyses microbiologiques de denrées alimentaires dans le cadre d'une démarche d'assurance-sécurité. *Vétérinaires Interarmées, (16)*, 206-212p.
- **Boumar, A. (2019).** *Evaluation de la qualité physicochimique et bactériologique du lait pasteurisé et du lait UHT pendant la période de consommation* (Master, Université 8 Mai 1945, Guelma).

C

- **Cayot & Lorient, D. (1998),** *Structure et techno fonction des protéines du lait*, Paris : Tec et doc, Lavoisier.
- **Chau, F., Lefort, A., & Fantin, B. (2008).** Intérêt et applications de la cytométrie de flux en bactériologie médicale. *Antibiotiques, 10(4)*, 226-231p.
- **Cheftel, J. C., & Lorient, D. (1982).** Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le lait, 62(617-620)*, 435-483p.
- **Cheftel, J.C., Cheftel, H. (1996).** *Introduction à la biochimie à la technologie des aliments.* Paris : Lavoisier. ISBN .2-85206-827-3p.
- **Christopher, H. (2009).** La caséine et le lactose du lait. Les conséquences sur l'organisme de la caséine et du lactose contenus dans le lait.
- **Codou, L. (1997).** *Etude des fraudes du lait cru : mouillage et écrémage* (mémoire de doctorat, université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal), 18p.

Références bibliographiques

- **Crini, G., & Badot, P. M. (2007).** Traitement et épuration des eaux industrielles polluées : Procédés membranaires, *bioadsorption et oxydation chimique*. Presses Univ. Franche-Comté.
- **Cuq, J. L. (2007).** Microbiologie alimentaire contrôle microbiologique des aliments. *Polytech département STIA, Université Montpellier, 2*, 119p.

D

- **Derby, G. (2001).** *Lait : nutrition et santé*, Paris : Tec et doc, Lavoisier.
- **Douad, D., Gillis J.C., Helaine E., & Lignac, J. (1985).** La maîtrise de la qualité du lait stérilisé UHT, Paris. : APRIA. P 55-77.
- **Dumoulin, E., & Peretz, G. (1993).** Qualité bactériologique du lait cru de chèvre en France. *Le Lait*, 73(5-6), 475-483p.
- **Duperray, C., Costes, V., Baldet, P., & Parpaleix, T. (1993).** Cytométrie en flux et en image : principes et applications. *Acta endoscopica*, 23(4), 285-294p.

E

- **El Hentati, F. Z., Iobagiu, C., & Lambert, C. (2009).** Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Francophone des laboratoires*, (410), 23-32p.
- **El Houda, Y. N. (2019).** *Contribution à l'étude et à l'évaluation de la qualité bactériologique des eaux de puits et de sources de la Wilaya de Constantine* (Master, Université des Frères Mentouri, Constantine).

F

- **Fairbairn, D. J., & Law, B. A. (1986).** Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, 53(1), 139-177p.
- **Faradji-Hamma, S (2016).** Techniques de contrôle microbiologique des aliments, 107p.
- **Feinberg, M., Favier, J. C., & Ireland-Ripert, J. (1987).** *Répertoire général des aliments. Tome 2 : Table de composition des produits laitiers* Paris : Lavoisier Tec ET Doc ; INRA.
- **Frouin, H. (2004).** Analyse en cytométrie de flux de l'influence de la salinité sur les fonctions hémocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*.

G

- **Gandon, Y., Petit, A., & Dechy, M. F. (1974).** Le lait UHT en conditionnement " Tetra Brik" aseptique. *Le Lait*, 54(539-540), 645-655p.

Références bibliographiques

- **Gosta B. (1995).** *Les composants du traitement du lait. Le lait en poudre : manuel de transformation du lait.* Sewden : Tetra Pack processing system AB, 442-375-384p.
- **Guiraud, J. P. (2003).** *Microbiologie alimentaire.* Paris: Dunod, 651 p.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Food microbiology, *main food Derivate from international methods* in Aggad, H., Bridja, M., Bouhai, A., Benaouali, M., & Djebli, A. *Some Quality Aspects of Pasteurized Milk in Algeria.* (Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, University of Tiaret, Algeria.), 1p.
- **Guiraud, J., & Galzy P. (1980).** *L'analyse microbiologique dans l'industrie alimentaire.* Paris : l'usine nouvelle. 236p.
- **Guiraud, J.P., & Rosec, J.P. (2004).** *Pratiques des normes en microbiologie alimentaire.* Edition : AFONR, 3p.
- **Guiraud JP. (1998).** *Microbiologie Alimentaire.* Paris : Dunod, 330-598p.

H

- **Hakmi, A. (2006).** *traitement de l'eau de source bousfer ORAN.* (Licence, Université des sciences et de la technologie, Oran).
- **Helmi, K. (2016).** *Application de la cytométrie en flux pour le contrôle microbiologique de l'efficacité de traitement de l'eau* (Doctoral dissertation, Cergy-Pontoise).
- **Heuchel, V., Marly, J., Meffe, N., MENARD, J., & PLASSOT, L. (2001).** Origines, diagnostic et moyens de maîtrise de la contamination du lait de vache par les salmonelles. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 87-90p.
- **Hézar, N., Simon, G., Droullé, A., & Nguyen, P. (2007).** La cytométrie en flux dans un laboratoire d'hémostase. *Revue francophone des laboratoires*, 2007(393), 63-71.

J

- **Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., & Brule, G. (2007).** Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc. *Lavoisier, (17)*, 456p.
- **Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., & Brule, G. (2008).** *Les produits laitiers*, 2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier, 184 p.
- **Jeantet, R., Schuck, P., Croguennec, T., & Brulé, G. (2006).** *Science des aliments. Biochimie, Microbiologie, Procédés, Produits. Volume 1 : Stabilisation Biologique et Physico-chimique.* Londres, Paris, New York : Tec & Doc-Lavoisier, 211p.
- **Jensen, R. G. (1995).** *Handbook of milk composition.* Academic press.
- **Joffin, C., & Joffin, J.N. (2003).** *Microbiologie alimentaire.* 5^{ème} édition : Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, 344p.

Références bibliographiques

- **Joffin, C. (1999).** Microbiologie alimentaire. URI. <http://hdl.handle.net/123456789/122167>.

L

- **Legrusse, J. (2003).** *Structure chimique et propriétés physicochimiques : Les vitamines dans les industries agroalimentaire*. Ed : Lavoisier, 5-23p.
- **Legry, P. (1988).** *Influence de la collecte sur la qualité du lait* (Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon).
- **Leyral, G., & Vierling, E. (2007).** *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires*.Rueil–Malmaison : Doin. Bordeaux : CRDP d’Aquitaine ,290 p.
- **Lortal, S ., & Delage MM. (2008).** *Comment conserver le lait ? : Agriculture, alimentation, environnement*. Edition : INRA-Rennes, 1p.
- **Luquet. (1985).** *Lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre*. Paris : Tec et Doc. Lavoisier.
- **Luquet, F.L. (1990).** *Lait et produits laitiers, vache, brebis, chèvre transformation et technologie*. Edition technique et documentation, 5p.

M

- **Madi, R., Merabet, M., & Madani, K. E. (2013).** *Analyse de répétabilité et de corrélation des paramètres physico-chimiques du lait UHT demi écrémé produit par la laiterie Tchinalait/Candia* (Master, Université Abderahmane. MIRA, Bejaia) ,35p.
- **Manceur, Y ., & Djaballah ,S. (2016).** *Analyse microbiologique de l'eau distribuée dans la ville de Tébessa* (Mémoire de master en Microbiologie appliquée à la santé et l'environnement, université Larbi Tébessi), (2-4-10-12) p.
- **Majoub, R., & Boudabbous, A. (1993).** Méthodes de conservation et rôle des microorganismes dans les produits laitiers. *MHA (Sousse)*, 5(14), 3-14p.
- **Mathieu, J. (1998).** *Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la Roche-Sur-Foron : Initiation à la physico-chimie du lait*. Paris : Lavoisier ,12-210p.
- **Michel, J.C, Pouliot, M ., & Richard, J. (2002).** *Lait de consommation*. Edition : Presse internationale polytechnique, 291p.
- **Michel, V. (2012).** *Qualité du lait cru : Impact sur la qualité sanitaire des produits laitiers transformés*. Pole Sanitaire Acti Séminaire Franco-Chinois 15 juin, France.
- **Möller, S. (2000).** *La reconstitution du lait*. Edition : Projet Bibliographique avec Sodiaal. Ivry-sur-Seine.32-34p.
- **Moukhtari, I. (2009).** *Etude de l'influence de certains facteurs limitants sur les paramètres de reproduction chez les bovins laitiers dans des élevages de l'est algérien* (Thèse de

Références bibliographiques

doctorat en science Biologie, Faculté science de la nature et de la vie, Mentouri Constantine) ,12p.

- **Mottar, J., & Naudts, M. (1979).** La qualité du lait chauffé à ultra-haute température comparée à celle du lait pasteurisé et stérilisé dans la bouteille. *Le lait*, 59(588), 476-488p.

N

- **Naimi, M (2019).** Cahier technique-2 : Techniques de contrôle microbiologique.
- **Neville, M. (1995).** The physical properties of human and bovine milks In JENSEN R. *Handbook of milk composition-General description of milks*, Academic Press, 82, 919p.
- **Noblet, B. (2012).** Le lait : produits, composition et consommation en France. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, 47(5), 242-249p.

O

- **Odet, G. (1995).** Fermented milks. *Bulletin-International Dairy Federation*, (300), 98-100p.
- **Ourtelli, S ., & et Brahim ,S. (2012).** Contribution à l'étude de l'efficacité du traitement des eaux usées de la station d'épuration de corps gras de Bejaia (CO.G.B) Labelle après ensemencement (Mémoire de Master en Environnement et Sécurité Alimentaire, université Abderrahmane MIRA de Bejaia) ,12-25 p.

P

- **Parciel, P., Corrot, G., & Sauvee, O. (1994).** Variations du point de congélation et principales causes du mouillage du lait de vache. *Rencontre Recherche Ruminants*, (1), 129-132p.
- **Pointurier, H. (2003).** *La gestion matières dans l'industrie laitière.* Éditions Tec & Doc.
- **Pougheon, S. (2001).** *Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et leurs conséquences en technologies laitières* (Doctoral dissertation).

R

- **Ramet, J. P., & Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. (1985).** *La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen.* Organisation des nations unies pour L'Alimentation et L'Agriculture.
- **Reibetanz, U., Haložan, D., Brumen, M., & Donath, E. (2007).** Flow cytometry of HEK 293T cells interacting with polyelectrolyte multilayer capsules containing fluorescein-labeled poly (acrylic acid) as a pH sensor. *Biomacromolecules*, 8(6), 1927-1933p.

Références bibliographiques

- **Reyes, J. (2006).** Cytométrie et microbiologie In Ronot X, Grunwald, D., Mayol, J. F., & Boutonnat, J. *La cytométrie en flux*. Paris : Tec et Doc Lavoisier, 187-209p.
- **Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K. F., & Scheper, T. (2001).** Flow cytometry in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3-4), 350-360p.
- **Rodier, J., Legube, B., Marlet, N., & coll. (2009).** *L'Analyse de l'eau*. Paris : DUNOD, 1400-1402p.
- **Ronot, X., & Pierrez, J. (1990).** La cytométrie en flux : analyse prospective de son évolution à court et long terme. *médecine/sciences*, (6).
- **Rouillard, S. (2004).** *Développement de méthodes impédancemétriques et biochimiques pour la détection rapide d'une faible contamination bactérienne en milieu liquide complexe* (Doctoral dissertation, Institut national d'agronomie de Paris Grignon, Paris).

S

- **Sadi, M., Tarmoul, F & Driche, M. (2007).** *Détermination de la pollution résiduelle d'une station d'épuration par lagunage naturel*. (Mémoire de master en Science de la Mer. Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral), (6-9) p.
- **Sainte Laudy, J., Ménétrey, C., Brianchon, C., Lienhardt-Roussie, A., & Cogné, M. (2009).** Évaluation de la cytométrie en flux par rapport aux tests de provocation en simple insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire chez l'enfant. *Revue Française d'Allergologie*, 49(6), 454-461p.
- **Sechet, P. (2001).** *Le Lait Uht : Généralités*. Surgères : Enilia, 34p.
- **Semasaka, G. (1986).** *Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar (Sénégal)*. (Docteur vétérinaire, Université de Dakar, Sénégal). Repéré à <http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/TD86-6.dir/TD86-6.pdf>
- **Sürmelihindi, G., Passchier, C. W., Leveau, P., Spötl, C., Bourgeois, M., & Bernard, V. (2019).** Barbegal: carbonate imprints give a voice to the first industrial complex of Europe. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 24, 1041-1058p.

V

- **Valero., Roudaut, H., LEfrancq, E. (2001).** *Science Et Technologie Du Lait*. France : Agrocampus-Rennes, 77p.
- **Veisseyre, G. (1975).** *Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait*. Paris : La Maison Rustique, 184-241p.

Références bibliographiques

- **Veisseyre, R. (1975).** *Technologie du lait : Principes des techniques laitières*. 3ème éd. Paris : SEPAIC, 714p.
- **Vignola, L. C. (2002).** *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses inter Polytechnique.
- **Vilain, A. C. (2010).** Qu'est-ce que le lait ? *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127p.

W

- **Wattiaux, M. A. (2004).** Métabolisme protéique chez la vache laitière. *L'institut Babcock pour la recherche et le développement international du secteur laitier, université du Wisconsin, Madison*.
- **World Health Organization. (1997).** *Guide pour le renforcement d'un programme national de salubrité des aliments* (No. WHO/FNU/FOS/96.2 Rev. 1). Genève : Organisation mondiale de la Santé.

Y

- **Yakhlef, H., Madani, T., Ghozlane, F., & Bir, B. (2010).** Rôle du matériel animal et de l'environnement dans l'orientation des Systèmes d'élevages bovins en Algérie. *la filière lait en Algérie*. *Communication aux*, (8).

Z

- **Zafrani, L., & Monneret, G. (2017).** Comprendre la cytométrie en flux. *Médecine Intensive Réanimation*, 26(6), 517p.

Normes et textes réglementaires

- **AFNOR. (1985).** Contrôle de la qualité des produits laitiers. 3ème édition .321 p.
- **Codex alimentarius. (1999).** Norme générale codex pour l'utilisation de termes de la laiterie. 12. 206. 17 p.
- **FAO. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Ed : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, Rome. 290p.
- **ISO 16040. (2003).** le principe général et le protocole technique pour la validation de méthodes alternatives dans le domaine de l'analyse microbiologique des denrées alimentaires.
- **JORA N° 69, (1993).** Arrêté interministériel du 27 Octobre 1993 relatif aux spécifications laits stérilisés et stérilisés ultra-haute température.
- **JORA N° 35, (1998).** Arrêté interministériel du 24 Janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.
- **JORA N° 80, (1999).** Arrêté interministériel du 27 Octobre 1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation.
- **JORA N° 19, (2000).** Arrêté interministériel du 2 Avril 2000 modifiant et complétant l'arrêté du 27 Octobre 1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation.
- **JORA N° 69. (2003).** Arrêté interministériel du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. Textes Législatifs. Lait et produits laitiers.
- **JORA N° 43, (2004).** Arrêté interministériel du 27 mars 2004 relative aux méthodes de contrôle microbiologique pour le lait stérilisé.
- **JORA N° 18, (2011).** Arrêté interministériel du 22 mars 2011 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- **JORA N° 39, (2017).** Arrêté interministériel du 2 juillet 2017 relatif aux Critères microbiologiques applicables aux certains denrées alimentaires.
- **Journal officiel des Communautés européennes. (1990).** Prescriptions relatives au traitement thermique. *Proposition de règlement (CEE) du Conseil arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait de consommation traité thermiquement.*

Annexes

Annexe I : La composition des milieux de culture

❖ **PCA (Plate Count Agar)**

- ✓ Tryptone.....5g
- ✓ Extrait de levures.....2,5g
- ✓ Glucose1,0g
- ✓ Agar agar bactériologique.....15,0g

pH à 7,0 + 0,2 à 25°C

❖ **Milieu VF (Gélose Viande Foie)**

- ✓ Peptone viande-foie..... 30,0 g
- ✓ Glucose 2,0 g
- ✓ Amidon soluble..... 2,0 g
- ✓ Sulfite de sodium..... 2,5 g
- ✓ Citrate de fer ammoniacal..... 0,5 g
- ✓ Agar agar bactériologique.....11,0 g

pH à 7,6 ± 0,2 à 25°C

❖ **Milieu BLBVB (Bouillon Lactosé Billé au Vert Brillant)**

- ✓ Peptone 10 g
- ✓ Lactose 10 g
- ✓ Bile de bœuf déshydratée 20 g
- ✓ Vert-brillant 13 ml
- ✓ Eau distillée.....1000 ml

pH à 7,2+ 0,2 à 25°C

❖ **Liquide Ringer dilué au ¼**

- ✓ Chlorure de sodium.....9 g
- ✓ Chlorure de potassium.....0,4 g
- ✓ Chlorure de calcium anhydre.....0,2g
- ✓ Bicarbonate de sodium.....0,20g
- ✓ Eau distillée.....1000 ml

pH à 7,0 à 25°C

❖ **Gélose Hektoen**

- ✓ Peptone pepsique de viande..... 12,0 g
- ✓ Extrait de levure.....3,0 g
- ✓ Lactose.....12,0 g
- ✓ Saccharose.....12,0 g
- ✓ Salicine.....2,0 g
- ✓ Sels biliaries..... 9,0 g
- ✓ Chlorure de sodium5,0 g
- ✓ Thiosulfate de sodium 5,0 g
- ✓ Citrate ferrique ammoniacal..... 1,5 g
- ✓ Bleu de bromothymol.....65 ml
- ✓ Fuchsine acide0,1 g
- ✓ Agar agar bactériologique.....13,5 g

pH 7,4-7,7 à 25°C

❖ **Bouillon Muller Kauffmann**

| | |
|--|---------|
| ✓ Extrait de viande..... | 4,3 g |
| ✓ Digestat enzymatique de caséine..... | 8,6 g |
| ✓ Chlorure de sodium (NaCl)..... | 2,6 g |
| ✓ Carbonate de calcium (CaCO ₃)..... | 38,7 g |
| ✓ Thiosulfate de sodium pentahydraté..... | 47,8 g |
| ✓ Sels biliaires à usage bactériologique..... | 4,78 g |
| ✓ Vert brillant..... | 9,6 mg |
| ✓ Eau distillée..... | 1000 ml |

pH à $8 \pm 0,2$ à 25 °C

❖ **Eau peptonée tamponé**

| | |
|---|---------|
| ✓ Digestat enzymatique de caséine..... | 10 g |
| ✓ Chlorure de sodium..... | 5 g |
| ✓ Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté | 9 g |
| ✓ Dihydrogénophosphate de potassium | 1,5 g |
| ✓ Eau distillée..... | 1000 ml |

pH à $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C

❖ **Milieu BCPL (Bouillon lactose au pourpre de Bromocrésol)**

| | |
|-----------------------------------|---------|
| ✓ Tryptone | 5,0 g |
| ✓ Extrait de viande | 3,0 g |
| ✓ Lactose..... | 10,0 g |
| ✓ Pourpre de bromocrésol..... | 25,0 mg |
| ✓ Agar agar bactériologique | 13,0 g |

pH à $7,0 \pm 0,2$ à 25°C

❖ **Milieu Rothe**

| | |
|----------------------------------|--------|
| ✓ Polypeptone..... | 20,0 g |
| ✓ Glucose..... | 5,0 g |
| ✓ Chlorure de sodium | 5,0 g |
| ✓ Phosphate monopotassique | 2,7 g |
| ✓ Phosphate dipotassique | 2,7 g |
| ✓ Azide de sodium | 0,2 g |

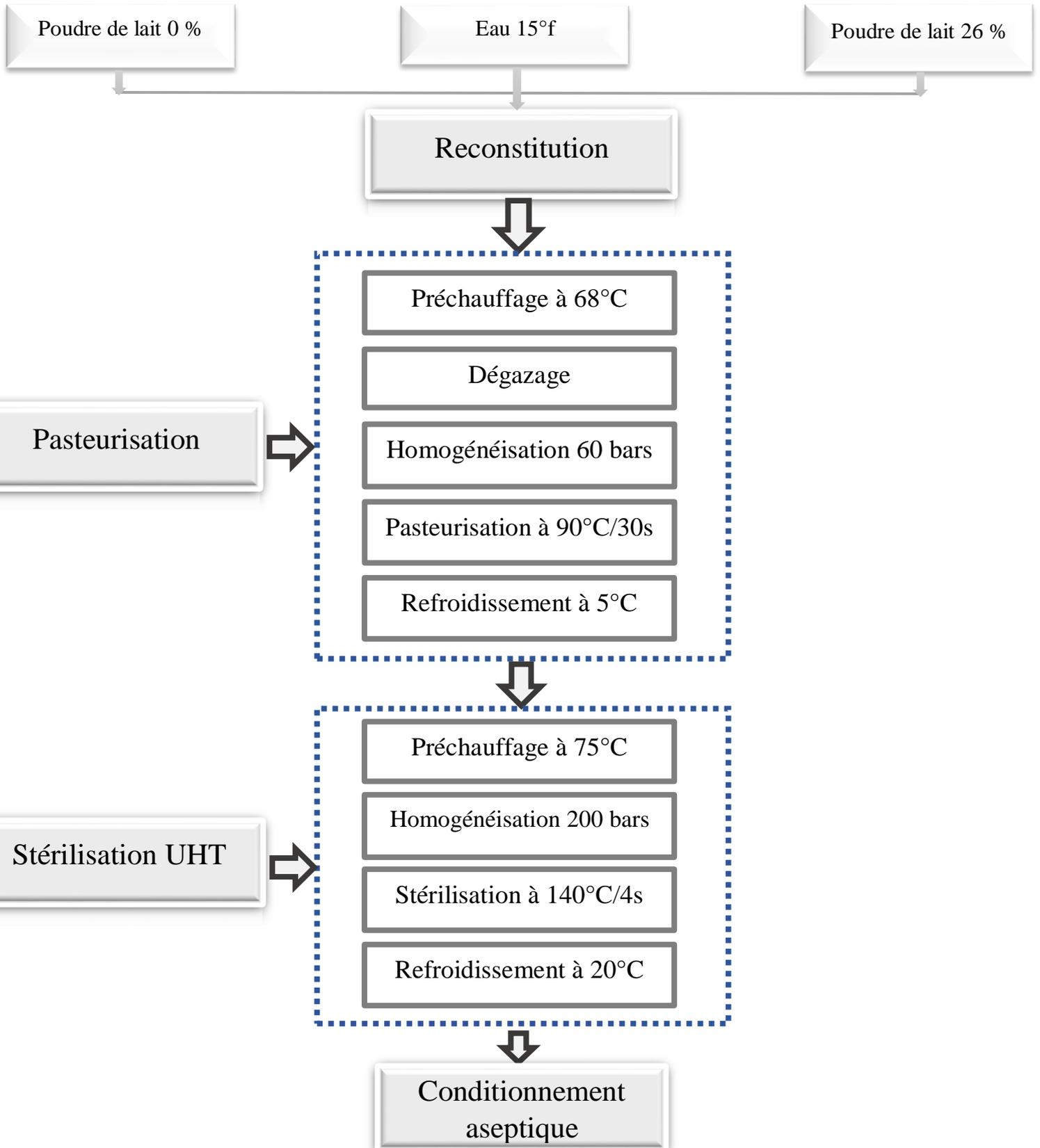
pH à $6,8 \pm 0,2$ à 25°C

❖ **Milieu Litsky**

| | |
|---------------------------------|--------|
| ✓ Polypeptone | 20,0 g |
| ✓ Glucose | 5,0 g |
| ✓ Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| ✓ Phosphate monopotassique..... | 2,7 g |
| ✓ Phosphate dipotassique..... | 2,7 g |
| ✓ Azide de sodium..... | 0,3 g |
| ✓ Ethyl-violet..... | 0,5 mg |

pH à $6,8 \pm 0,2$ à 25°C

Annexe II : Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT demi écrémé.



Annexe III : Numération sur milieu liquide

Tableau XXVIII : Tableau de Mac Grady de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP (Rodier *et al.*, 2005).

| Nombre caractéristique | Nombre de cellules | Nombre caractéristique | Nombre de cellules |
|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 001 | 3 | 300 | 23 |
| 010 | 3 | 301 | 39 |
| 100 | 4 | 302 | 64 |
| 101 | 7 | 310 | 43 |
| 110 | 7 | 311 | 75 |
| 111 | 11 | 312 | 120 |
| 120 | 11 | 320 | 93 |
| 200 | 9 | 321 | 150 |
| 201 | 14 | 322 | 210 |
| 210 | 15 | 330 | 240 |
| 211 | 20 | 331 | 460 |
| 220 | 21 | 332 | 1100 |
| 221 | 28 | | |

RESUME

Le lait est un aliment complet. Il occupe une place très importante dans la ration alimentaire. Les industriels producteurs de lait redoublent d'effort pour garantir la disponibilité et la qualité de ce produit afin de répondre à la forte demande du marché local. Plusieurs méthodes sont utilisées pour surveiller la qualité microbiologique du lait commercialisé. L'objectif de ce travail est de comparer l'utilisation des méthodes de bactériologie classique et de la cytométrie en flux pour le contrôle de la qualité du lait UHT. Dans un premier temps, un suivi de la qualité bactériologique et physicochimique des matières premières a été réalisé pour s'assurer du respect des bonnes pratiques de fabrication. Par la suite, les deux méthodes d'analyses bactériologiques ont été réalisées sur le produit fini. Les résultats ont montré que les matières premières utilisées étaient conformes aux normes. Les résultats des analyses bactériologiques du produit fini obtenue par les deux méthodes ont confirmés qu'il était conforme aux normes. Ce travail nous a permis de constater que l'utilisation de la cytométrie en flux à un grand avantage car elle fournit des résultats précis, fiables et rapides. La bactériologie classique reste la méthode de référence pour la réalisation des analyses des produits. Elle est fiable mais nécessite plus de temps pour l'obtention des résultats.

Mots -clés : analyses bactériologiques, lait UHT, bactériologie classique, cytométrie en flux.

ABSTRACT

Milk is a complete food. It occupies a very important place in the feed ration. Industrial milk manufacturers are redoubling their efforts to guarantee the availability and quality of this product in order to meet the strong demand of the local market. Several methods are used to monitor the microbiological quality of the milk sold. The focus of this work is to compare the use of classical bacteriological methods and flow cytometry for the quality control of UHT milk. First, the bacteriological and physicochemical quality of the raw materials was monitored to ensure compliance with good manufacturing practices. Subsequently, the two bacteriological analysis methods were carried out on the finished product and the results showed that the raw materials used met the standards and confirmed that it complied with the standards. The results of bacteriological analyzes of the finished product obtained by the two methods confirmed that it complied with the standards. This work has shown us that the use of flow cytometry has a great advantage because it provides precise, reliable and quick results. Classical bacteriology remains the reference method for carrying out product analyzes. It is reliable but takes longer to get results.

Key words: bacteriological analyzes, UHT milk, classical bacteriology, flow cytometry.

ملخص

الحليب غذاء كامل يحتل مكانة هامة في التغذية. بحيث يبذل منتجو الحليب الصناعي جهودهم، لضمان وفرة وجودة هذا المنتج، من أجل تلبية حاجة المستهلك في السوق المحلي. يتم استخدام عدة طرق لمراقبة الجودة الميكروبيولوجية للحليب المسوق. والهدف من هذا العمل المنجز هو مقارنة استخدام الطرق البكتريولوجية الكلاسيكية مع قياس التدفق السيتومتري لمراقبة جودة الحليب المعقم. في البداية، تمت متابعة مراقبة الجودة البكتريولوجية والفيزيائية الكيمائية للمواد الخام، لضمان الامتثال لممارسة التصنيع الجيد. بعد ذلك، تم انجاز طريقتين للتحليل البكتيري على المنتج النهائي. بينت النتائج أن المواد الخام المستخدمة مطابقة للمواصفات القياسية. كما أكدت ايضا نتائج التحاليل البكتريولوجية للمنتج النهائي التي تم الحصول عليها بالطريقتين أنها تتوافق مع المعايير. فهذا العمل سمح لنا بإثبات أن استخدام قياس التدفق السيتومتري له ايجابية عالية لأنه يعطي نتائج دقيقة وموثوقة وسريعة. وعليه يظل علم البكتريولوجي الكلاسيكي هو الأسلوب المرجعي لإجراء تحاليل المنتج. إنها موثوقة ولكنها تتطلب مزيداً من الوقت للحصول على النتائج .

الكلمات المفتاحية: التحليلات البكتريولوجية، الحليب المعقم، علم البكتريولوجي الكلاسيكي، قياس التدفق السيتومتري.